

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Pedro António de Brito Tavares

Estudo de Novos Centros Contendo Ferro

Isolamento e Caracterização de Proteínas
de
Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774



Lisboa, 1994

Pedro António de Brito Tavares

Estudo de Novos Centros Contendo Ferro

Isolamento e Caracterização de Proteínas
de
Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Doutor em
Bioquímica, pela Universidade Nova
de Lisboa, Faculdade de Ciências e
Tecnologia.

Lisboa, 1994

- N° de arquivo:

- "Copyright":

à Alice

Agradecimento

A presente tese de doutoramento foi realizada no Centro de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa (CTQB/UNL). A sua execução só foi possível graças ao envolvimento e participação de várias pessoas. Por isso, e contrariamente à opinião expressa por alguns colegas, planear e executar o trabalho experimental e escrever esta tese não foi um trabalho meramente pessoal, como facilmente se verificará nos agradecimentos seguintes.

À Prof. Isabel Moura gostaria de agradecer a oportunidade que me deu ao aceitar ser orientadora desta tese e me confiar tão interessantes sistemas. A sua ajuda no planeamento e execução do trabalho laboratorial foi essencial à obtenção dos resultados descritos nesta tese. A sua capacidade de reunir os meios necessários para o trabalho aqui descrito é, sem dúvida, notável. Esta tese é também um reflexo da sua extraordinária capacidade de trabalho e conhecimento.

Ao Prof. Boi Hanh Huynh (Departamento de Física, Emory University, USA) agradeço a simpatia e amizade com que me acolheu no seu laboratório. A ele devo a formação necessária à execução de uma grande parte desta tese. Foi com grande prazer que trabalhei ao seu lado e que beneficei da sua grande capacidade pedagógica e do método e o rigor com que sempre executa o seu trabalho.

Ao Prof. José J. G. Moura agradeço o interesse demonstrado por este trabalho, bem como a sua imprescindível participação. A sua dinâmica e capacidade mobilizadora contribuiu para aumentar os meios disponíveis e consequentemente facilitar em muito o meu trabalho.

Ao Prof. Jean LeGall (Departamento de Bioquímica, University of Georgia, USA) agradeço ter facultado a obtenção dos vários extratos celulares de *D. desulfuricans* ATCC 27774 utilizados nesta tese, e por ter disponibilizado o seu laboratório na Universidade da Georgia sempre que me foi necessário.

À Alice Pereira, à Anjos Macedo, ao Ricardo Franco e ao Jorge Caldeira, pelo seu espírito altruísta pois sempre revelaram uma grande disponibilidade em ajudar na manutenção e evolução do nosso local de trabalho.

Ao Dr. Natarajan Ravi agradeço a disponibilidade demonstrada e a ajuda na interpretação dos dados de Mössbauer, que foram determinantes para a caracterização das proteínas apresentadas neste trabalho.

Ao Prof. Jorge Lampreia pela colaboração no trabalho conducente à obtenção da sequência parcial da desulfoferrodoxina. Gostaria também de expressar o meu agradecimento por ter sido o principal causador do meu interesse pelos computadores pessoais.

Ao Prof. Van Beeumen (Laboratório de Microbiologia, Universidade de Gent, Bélgica) agradeço ter disponibilizado os meios e a experiência necessários à sequenciação da desulfoferrodoxina.

Ao Dr. J.K. Wunderlich (Departamento de Bioquímica, University of Georgia, USA) agradeço ter efectuado a síntese química do polipeptídeo utilizado no capítulo IV.

Aos meus colegas de grupo, Carla Carneiro, Catarina Gião, Cristina Costa, Cristina Moreno, Mauro Scharf, Nuno Palma, Susana Prazeres, Rui Duarte, Prof. Ana Rosa Lino e Prof. Belarmino Barata quero agradecer a sua presença e por terem partilhado o mesmo espaço de trabalho durante a execução desta tese.

Ao Prof. Miguel Teixeira pela ajuda na obtenção dos dois espectros de Mössbauer integrados no capítulo IV.

Ao Prof. António Xavier, na qualidade de director do Centro de Tecnologia Química e Biológica, por ter apoiado a minha candidatura à bolsa de doutoramento e ter disponibilizado as infraestruturas existentes no CTQB.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT) por me ter concedido uma bolsa de doutoramento que tornou possível a execução desta tese.

Por último dois agradecimentos muito especiais. À Alice pela sua ajuda incondicional no trabalho laboratorial e nas sensatas discussões dos dados experimentais.

Nunca esquecerei a sua inestimável ajuda na preparação deste manuscrito. Aos meus pais gostava de agradecer a ajuda preciosa e persistente ao longo dos 21 anos de estudo que culminaram nesta tese. Nunca deixaram de me incentivar para perseguir os meus sonhos. Por todos estes motivos, e por serem os meus pais, ficar-lhes-ei eternamente grato.

Resumo

Negligenciadas durante bastante tempo, as proteínas com centros de ferro não hémico têm vindo a ser encontradas como componentes de sistemas essenciais à vida. Estas proteínas estão envolvidas em processos metabólicos como sejam o ciclo de Krebs, a fotossíntese, a cadeia respiratória e a síntese e reparação de DNA e ainda a regulação da translação, a nível do mRNA. Ao longo dos anos, as bactérias redutoras de sulfato têm sido uma fonte de proteínas deste tipo. Enzimas como as hidrogenases, as redutases do APS, as redutases do sulfito ou as ferredoxinas foram já isoladas e caracterizadas, revelando propriedades bioquímicas e espectroscópicas únicas. Nesta dissertação descreve-se o estudo de novos tipos de centros de ferro não hémico, encontrados em proteínas isoladas de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774.

A rubreritrina é uma proteína dimérica (2 x 24 kDa) que contém, por monómero, dois tipos de centros: i) um centro monomérico do tipo rubredoxina, no qual o átomo de ferro se encontra coordenado tetraedricamente por resíduos de cisteína e ii) um centro binuclear de ferro muito semelhante ao descrito para a redutase de ribonucleotídeos (subunidade B2), possuindo uma ponte μ -oxo entre os dois ferros. Esta invulgar associação de centros confere à rubreritrina propriedades espectroscópicas únicas. Assim, o seu espectro de UV-visível apresenta máximos a 370 e 493 nm. Após a subtração do espectro da rubredoxina, isolada do mesmo organismo, é possível observar um novo máximo a 362 nm típico de um centro binuclear do tipo descrito. Tal como nas rubredoxinas, o espectro de RPE apresenta ressonâncias a $g = 9.6$ e 4.3 . É ainda possível observar, a campo alto, um sinal rômbico ($g = 1.98, 1.76$ e 1.56) característico da forma semi-reduzida do centro binuclear. A análise dos dados provenientes da espectroscopia de Mössbauer confirma a presença dos centros referidos, sendo possível detectar todos os seus estados de oxidação.

A desulfoferredoxina é outra proteína que apresenta uma nova associação de centros de ferro. Uma única cadeia polipeptídica (13.9 kDa) fornece os ligandos necessários para a coordenação dos dois centros monoméricos. Um dos centros é semelhante ao presente

na desulforedoxina de *Desulfovibrio gigas*. Neste centro, o átomo de ferro é coordenado por quatro resíduos de cisteína numa geometria tetraédrica distorcida. Espectroscopicamente este centro revela-se pela existência de máximos no espectro de UV-visível a 495 e 368 nm e ressonâncias a $g = 7.7, 5.7, 4.1$ e 1.8 , no espectro de RPE. No estado oxidado o espectro de Mössbauer apresenta uma espécie magnética que pode ser simulada com os parâmetros descritos para a desulforedoxina. A natureza da coordenação do centro é revelada pelo valor obtido para o desvio isomérico (0.25 e 0.70 mm/s, respectivamente para o estado oxidado e reduzido). O potencial de oxidação-redução determinado, 4 mV, é também semelhante ao obtido para a desulforedoxina. O segundo centro, designado por centro II, é também monomérico e apresenta um novo tipo de coordenação. Na forma oxidada, o espectro de UV-visível apresenta contribuições a 335 e 635 nm e o espectro de RPE contém novas ressonâncias a $g = 9.6$ e 4.3 . Os parâmetros obtidos pela simulação do espectro de Mössbauer são característicos de uma coordenação penta ou hexaédrica mista (ligandos S, N e/ou O). Uma característica deste centro é o seu elevado potencial de oxidação-redução (240 mV). Este facto permitiu o isolamento aeróbico da proteína em dois estados de oxidação: i) forma cinzenta ou totalmente oxidada (i.e., os dois centros encontram-se no estado férrico) e ii) forma rosa ou semi-reduzida (i.e., apenas o centro I se encontra no estado férrico).

Dados preliminares da estrutura primária da desulfoferrodoxina indicam uma grande semelhança na parte N-terminal (os primeiros 36 resíduos) entre esta proteína e a desulforedoxina. Com o objectivo de estudar esta subestrutura, procedeu-se à síntese total da desulforedoxina. Assim, a cadeia polipeptídica foi construída por síntese química e o centro de ferro foi reconstituído. As características bioquímicas e espectroscópicas indicam que a proteína sintética possui uma estrutura equivalente à proteína isolada de *Desulfovibrio gigas*.

Finalmente, foi ainda isolada uma nova proteína de ferro-enxofre. Esta proteína, um monómero com a massa molecular de 58 kDa, contém um novo tipo de agregados de ferro-enxofre. Segundo o modelo utilizado para analisar os dados espectroscópicos obtidos, esta proteína contém dois agregados de $[6\text{Fe-6S}]$. No estado nativo, um dos agregados (denominado agregado I) possui um espectro de RPE com uma ressonância a $g = 15.3$,

indicativa do facto de estarmos na presença de um sistema com $S = 9/2$ e $E/D = 0.062$. Dados de Mössbauer provaram que neste estado o segundo agregado é diamagnético. Dados conjugados destas duas últimas espectroscopias indicam que a proteína pode ser estabilizada em diversos estados de oxidação, possuindo a capacidade de trocar vários electrões.

Abstract

Although neglected for a long time, non-heme iron proteins are now acknowledged to participate in important metabolic systems as the Krebs cycle, photosynthesis, respiratory chain and DNA synthesis and maintenance. For many years, sulfate reducing bacteria have been a major source of this type of proteins. Enzymes such as APS reductases, hydrogenases, sulfite reductases or ferredoxins have been isolated and characterized, revealing unique biochemical and spectroscopic properties. In this thesis is described the isolation and characterization of several proteins purified from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, possessing new types of non heme iron centers.

Rubrerithryn is a dimeric protein (2 x 24 kDa). Each monomer contains two different types of centers: *i)* a monomeric rubredoxin type center, where the iron atom is tetrahedrally coordinated to cysteinyl residues and *ii)* a binuclear iron center with a μ -oxo bridge, similar to the one found in ribonucleotide reductase B2 subunit. This unusual association of centers results in unique spectroscopic properties. The UV-visible spectrum of rubrerithryn has maxima at 370 and 493 nm. Upon subtraction of *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 rubredoxin spectrum a new maximum at 362 nm is obtained, typical for the binuclear center. The EPR spectrum shows resonances at $g = 9.6$ and 4.3 , typical of rubredoxin centers, and a high field rhombic signal ($g = 1.98, 1.76$ and 1.56) that can be ascribed to the binuclear center half reduced form. Analysis of Mössbauer data shows the presence of these two types of centers in all the possible oxidation states.

Desulfoferredoxin is another protein that possesses a new association of iron centers. A single polypeptide chain (13.9 kDa) provides the ligands for the two monomeric centers. One of the centers is similar to the iron center of *Desulfovibrio gigas* desulfoferredoxin. In this center the iron atom is coordinated by four cysteinyl residues in distorted tetrahedral geometry. Spectroscopically this center gives rise to UV-visible maxima at 495 and 368 nm and EPR resonances at $g = 7.7, 5.7, 4.1$ and 1.8 . The Mössbauer spectrum of the oxidized state is correctly simulated using the parameters reported for desulfoferredoxin. The low values

obtained for the isomer shift (0.25 mm/s state and 0.70 mm/s, for the oxidized and reduced states) expose the sulfur ligation. The redox potential determined, 4 mV, is also in agreement with the value obtained for desulforedoxin. The second center (center II) is a monomeric possessing a new type of coordination. In the oxidized form, the UV-visible spectrum shows maxima at 335 and 635 nm, and the EPR spectrum shows additional resonances at $g = 9.6$ and 4.3 . Mössbauer parameters are in agreement with a penta or octacoordinated center, probably with mixed ligation (S, O and/or N ligands). The very high redox potential of center II (240 mV) enable to aerobically isolate the protein in two different oxidation states: *i*) the gray or totally oxidized form (with both centers in the ferric state) and *ii*) the pink or half-reduced form (where only center I is in the ferric state).

Preliminary data for the primary structure of desulfoferrodoxin shows that the N-terminal region (first 36 residues) as a very high degree of homology with desulforedoxin. With the purpose of studying this substructure, an attempt was made to create a totally synthetic desulforedoxin. This was accomplished in two steps: *i*) chemical synthesis of the polipeptide chain and *ii*) reconstitution of the iron center. Biochemical and spectroscopic characterization showed that the synthetic protein is structurally equivalent to desulforedoxin isolated from *Desulfovibrio gigas*.

Finally, it was isolated a new iron-sulfur protein. This protein is a monomer of molecular mass equal to 58 kDa that contains a new cluster type. The model presented in this thesis, based on EPR and Mössbauer spectroscopic data, assumes that the protein contains two distinct [6Fe-6S] clusters. In the native state, the EPR spectrum of one of these clusters (cluster I) shows a resonance at $g = 15.3$, attributed to a $S = 9/2$ spin system with $E/D = 0.062$. In this state, Mössbauer data proves that cluster II is diamagnetic. The conjunction of EPR and Mössbauer spectroscopies indicate that this protein can be stabilized in several different oxidation states, thus being able to exchange several electrons with other redox partners.

Abreviaturas

ABS	Absorvância
ADP	Adenosina difosfato
APS	Sulfato de adenilil
ATP	Adenosina trifosfato
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
CDO	Comprimento de onda
<i>D.</i>	<i>Desulfovibrio</i>
<i>D.d.</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
DEAE	Dietil-amino-etilcelulose
Dfx	Desulfoferrodoxina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTPA	Ácido dietilenotriaminapenta-acético
<i>Drm.</i>	<i>Desulfuromonas</i>
Dx	Desulforedoxina
FAD	Flavina-adenina-dinucleótido
Fd	Ferredoxina
FMN	Flavina-mono-nucleótido
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
Hr	Hemeritrina
HTP	Hidroxilapatite
IPNS	Sintetase da isopenicilina N
IRE-BP	Proteína de ligação ao elemento regulador do ferro
MMO	Mono-oxigenase do metano
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (forma reduzida)

NHE	Electrodo padrão de hidrogénio
PAP	Fosfatase ácida púrpura
Pi	Foasfato inorgânico
Rb	Rubredoxina
rbo	Oxido-redutase da rubredoxina
RNA	Ácido ribonucleico
RNR	Redutase de ribonucleótidos
RPE	Ressonância paramagnética electrónica
Rr	Rubreritrina
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoracético
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
Tris	tris(hidroximetil)aminoetano

Índice

I. As bactérias redutoras de sulfato.	1
1. Introdução.	3
2. Filogenia das bactérias redutoras de sulfato.	3
3. Importância ecológica.	6
4. Importância económica.	7
5. Algumas proteínas isoladas de	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774	8
5.1. Citocromos	8
5.2. Proteínas de transporte electrónico.	9
5.3. Hidrogenase.	9
5.4. Enzimas envolvidas na redução dissimilativa do sulfato.	10
5.5. Desidrogenases e redutases.	10
6. Bibliografia	12
II. Centros de Ferro-Enxofre	15
1. Introdução.	17
2. Centros do tipo FeS ₄ .	17
2.1. Rubredoxinas.	20
2.2. Desulforedoxina.	22
3. Agregados de [2Fe-2S].	23
3.1. Agregados do tipo Fe ₂ S ₂ Cis ₄	23
3.2. Agregados do tipo "Rieske"	25
4. Agregados de [4Fe-4S].	27
5. Agregados de [3Fe-4S].	31
6. Interconversão entre [3Fe-4S] e [4Fe-4S].	33
7. Agregados heterometálicos do tipo [M,3Fe-4S]	33
8. Agregados com estequiometria superior.	34

8.1. A nitrogenase	34
8.2. As hidrogenases de ferro	40
8.3. As redutases do sulfito	41
9. O agregado de [xFe-4S] como elemento regulador da função enzimática.	42
10. Bibliografia	57
III. Proteínas contendo centros binucleares de ferro.	69
1. Introdução.	71
2. Hemeritrina.	72
3. A reductase de ribonucleotídeos.	76
4. A mono-oxigenase do metano.	81
5. Fosfatases ácidas púrpuras.	87
6. Bibliografia	98
IV. A Desulforedoxina Sintética	103
1. Introdução	105
2. Síntese da cadeia polipeptídica.	105
3. Reconstituição do centro metálico.	105
4. Composição e sequência de ácidos aminados.	107
5. Determinação do conteúdo em ferro.	107
6. Espectroscopia de UV-visível.	111
7. Espectroscopia de RPE	111
8. Espectroscopia de Mössbauer.	112
9. Discussão.	115
10. Bibliografia	118
V. A Rubreritrina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774	119
1. Introdução.	121
2. Purificação.	128
3. Determinação da massa molecular.	131
4. Determinação do conteúdo em ferro.	131

5. Determinação do N-terminal.	132
6. Determinação da composição em ácidos aminados.	133
7. Estudos espectroscópicos.	135
7.1. Espectroscopia de UV-visível.	135
7.2. Espectroscopia de RPE.	137
7.3. Espectroscopia de Mössbauer.	142
8. Discussão.	151
9. Bibliografia.	152
VI. A Desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	153
1. Introdução.	155
2. Purificação	157
3. Determinação da massa molecular.	161
4. Determinação do conteúdo em ferros.	163
5. Determinação da composição em ácidos aminados	163
6. Determinação do N-terminal e sequência parcial	165
7. Estudos espectroscópicos.	170
7.1. Espectroscopia de UV-visível.	170
7.2. Espectroscopia de RPE.	176
7.3. Espectroscopia de Mössbauer.	189
8. Discussão.	200
9. Bibliografia.	207
VII. Caracterização de uma nova proteína de ferro-enzofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774	209
1. Introdução.	211
2. Purificação.	213
3. Determinação da massa molecular.	215
4. Determinação do conteúdo em ferro.	215
5. Determinação do enxofre lábil.	217
6. Determinação da composição em ácidos aminados.	217

7. Determinação do N-terminal.	219
8. Estudos espectroscópicos.	219
8.1. Espectroscopia de UV-visível.	219
8.2. Espectroscopia de RPE.	222
8.3. Espectroscopia de Mössbauer.	233
9. Discussão.	250
10. Bibliografia.	253
Apêndice A. Métodos	255
1. Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.	257
2. Determinação de proteína - Método de Lowry.	260
3. Determinação do conteúdo em ferro - Método do TPTZ.	261
4. Meio de crescimento e preparação do extrato celular.	263
5. Hidrólise ácida.	265
6. Oxidação perfórmica.	268
7. Preparação de soluções tampão.	268
7.1. Tampão fosfato.	268
7.2. Tampão Tris-HCl.	269
8. Titulações potenciométricas.	270
9. Determinação das constantes de calibração dos espectros de Mössbauer.	276
10. Espectrofotômetro de UV-visível.	276
11. Espectrômetro de RPE.	276
12. Bibliografia.	278
Apêndice B. REDZ - Programa de redução/conversão para espectros de UV-visível.	279
1. Introdução.	281
2. Descrição do Programa REDZ.	281
3. Listagem do programa.	282

Índice de Figuras

Figura I.1 - Posição filogenética dos diversos géneros de bactérias redutoras de sulfato na natureza	5
Figura II.1 - Estruturas de diferentes agregados de ferro-enxofre.	18
Figura II.2 - Reconstituição, interconversão de agregados [3Fe-4S] e [4Fe-4S]. Formação de agregados heterometálicos.	35
Figura II.3 - Caminho dos electrões na redução do azoto molecular pela nitrogenase.	38
Figura II.4 - Estados de oxidação possíveis e gama de potenciais de oxidação-redução dos diversos agregados de ferro-enxofre.	47
Figura III.1 - Estrutura obtida pela cristalografia de raios-X para duas diferentes formas da hemeritrina.	74
Figura III.2 - Reacção de redução dos ribonucleotídeos.	77
Figura III.3 - Representação gráfica da estrutura obtida através da cristalografia de raios-X para o centro binuclear da RNR.	80
Figura III.4 - Intermediários reactivos detectados durante um ciclo catalítico da hidroxilase da MMO.	85
Figura III.5 - Modelo proposto por Nordlund e colaboradores para a coordenação do centro binuclear presente na hidroxilase da MMO.	88
Figura III.6 - Modelo proposto por DeRose e colaboradores para a coordenação parcial do centro binuclear presente na hidroxilase da MMO.	88
Figura III.7 - Modelo proposto por Vincent e colaboradores para a coordenação do centro binuclear presente nas fosfatases ácidas púrpura.	90
Figura IV.1 - Sequência de ácidos aminados da proteína sintética.	107
Figura IV.2 - Espectros de UV-visível obtidos em diversas fases da reconstituição.	109
Figura IV.3 - Curvas obtidas para a titulação potenciométrica da desulforedoxina sintética.	110

Figura IV.4 - Espectro de RPE da desulforedoxina sintética.	113
Figura IV.5 - Espectro de Mössbauer da forma nativa (oxidada) da desulforedoxina sintética (4.2 K, 0.95 kG //).	114
Figura IV.7 - Espectro de Mössbauer da forma reduzida da desulforedoxina sintética.	115
Figura V.1 - Espectros de UV-visível da rubreritrina e da rubredoxina de <i>D. vulgaris</i> .	122
Figura V.2 - Espectro de RPE da rubreritrina de <i>D. vulgaris</i> .	123
Figura V.3 - Comparação parcial da sequência da rubreritrina <i>D. vulgaris</i> com a redutase da mono-oxigenase do metano (MMO) de <i>M. capsulatus</i> .	126
Figura V.4 - Modelo de coordenação do centro binuclear da rubreritrina de <i>D. vulgaris</i> .	126
Figura V.5 - Esquema da purificação da rubreritrina a partir do extrato celular de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	129
Figura V.6 - Determinação da massa molecular da rubreritrina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	130
Figura V.7 - Comparação das sequências do N-terminal das Rubreritrinas de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 e <i>D. vulgaris</i> e da Nigeritrina de <i>D. vulgaris</i> .	132
Figura V.8 - Comparação do espectro de UV-visível da rubreritrina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 com o espectro da rubredoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	136
Figura V.9 - Espectro de RPE da rubreritrina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	139
Figura V.10 - Espectro de RPE da rubreritrina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 a campo baixo.	140
Figura V.11 - Curvas de saturação da ressonância a $g = 1.76$, do espectro de RPE da rubreritrina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	141
Figura V.12 - Espectro de Mössbauer da forma nativa da rubreritrina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (Amostra I, 500 G //, 4.2 K).	143

Figura V.13 - Espectro de Mössbauer da rubreritrina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (Amostra I), após a reoxidação com ferricianeto de potássio (500 G //, 4.2 K).	145
Figura V.14 - Espectro de Mössbauer da forma nativa da rubreritrina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (Amostra II, 500 G //, 4.2 K).	146
Figura V.15 - Espectro de Mössbauer da rubreritrina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (Amostra II) após redução com ditionito de sódio (4.2 K).	147
Figura VI.1 - Esquema de purificação da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	160
Figura VI.2 - Comportamento das amostras de desulfoferrodoxina num gel de poliacrilamida (12.5%) na presença de 1% de SDS.	162
Figura VI.3 - Sequência parcial da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	168
Figura VI.4 - Espectro de visível da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 na forma cinzenta e na forma rosa.	171
Figura VI.5 - Titulação da forma rosa da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 com ferricianeto de potássio.	173
Figura VI.6 - Modelo usado para simular os dados provenientes da titulação potenciométrica.	174
Figura VI.7 - Curvas obtidas para a titulação potenciométrica da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	175
Figura VI.8 - Espectros de RPE da forma cinzenta e da forma rosa da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	179
Figura VI.9 - Diagrama de valores de g em função da rombicidade (E/D) de um sistema com $S = 5/2$.	180
Figura VI.10 - Espectros de RPE da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774, a diferentes temperaturas.	181
Figura VI.11 - Curvas teóricas para a variação da população de cada dubleto de Kramer, de um sistema com $S = 5/2$, com a temperatura.	182

Figura VI.12 - Comparação entre os espectros de RPE da desulfoferrodoxina adquiridos com o campo da micro-onda perpendicular e paralelo ao da radiofrequência, em três diferentes estados de oxidação.	183
Figura VI.13 - Espectro de RPE da forma cinzenta da desulfoferrodoxina após adição de cianeto de potássio.	187
Figura VI.14 - Espectro de RPE da forma rosa da desulfoferrodoxina após adição de cianeto de potássio.	188
Figura VI.15 - Espectro de Mössbauer da forma rosa da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (500 G //, 4.2 K).	191
Figura VI.16 - Espectro de Mössbauer da forma cinzenta da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (500 G //, 4.2 K).	192
Figura VI.17 - Espectro de Mössbauer da forma cinzenta da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (500 G \perp , 4.2 K)	193
Figura VI.18 - Espectro de Mössbauer da forma cinzenta da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774, na presença de diferentes campos magnéticos aplicados (4.2 K).	197
Figura VI.19 - Espectro de Mössbauer da forma cinzenta da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774, após adição de ascorbato de sódio em quantidades equimolares (500 G //, 4.2 K).	198
Figura VI.20 - Espectro de Mössbauer da desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774, após adição de ditionito de sódio (4.2 K).	199
Figura VI.21 - Hipóteses admitidas para a coordenação do centro metálico na desulfoferrodoxina <i>D. gigas</i> .	201
Figura VI.22 - Curvas teóricas calculadas com base na equação de Nernst para a variação da percentagem de forma oxidada em função do potencial.	206

Figura VII.1 - Esquema da purificação da nova proteína de ferro enxofre isolada de extratos celulares de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	214
Figura VII.2 - Determinação da massa molecular da nova proteína de ferro enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	216
Figura VII.3 - N-terminal da nova proteína de ferro-enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	220
Figura VII.4 - Espectro de UV-visível da nova proteína de ferro-enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	221
Figura VII.5 - Dependência de temperatura do espectro de RPE para a forma nativa da nova proteína de ferro-enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	223
Figura VII.6 - Diagramas de valores de g em função da rombicidade (E/D) para um sistema com S = 9/2 e D negativo.	224
Figura VII.7 - Variação da intensidade do sinal a g = 15.3, presente na amostra nativa, em função da temperatura.	225
Figura VII.8 - Espectro de RPE da nova proteína de ferro-enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 após redução com metilo de viologénio.	227
Figura VII.9 - Dependência de temperatura do espectro de RPE para a forma totalmente reduzida da nova proteína de ferro-enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	230
Figura VII.10 - Espectros de RPE obtidos a diferentes potenciais. Variação entre 300 e -500 mV, obtida por adição de alíquotas de uma solução de ditionito de sódio.	231
Figura VII.11 - Espectros de RPE obtidos a diferentes potenciais. Variação entre 70 e -180 mV, obtida por adição de alíquotas de uma solução de viologénio de metilo reduzido com hidrogenase/H ₂ .	232
Figura VII.12 - Espectros de Mössbauer da forma nativa da nova proteína de ferro enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (4.2 K).	234
Figura VII.13 - Espectro de Mössbauer típico de um sistema uniaxial (g// >> g _⊥).	236

Figura VII.14 - Espectro de Mössbauer da forma nativa da nova proteína de ferro enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (140 K).	236
Figura VII.15 - Espectros de Mössbauer da forma nativa da nova proteína de ferro enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 após subtração do dubleto de quadrupolo central (espécie diamagnética).	238
Figura VII.16 - Espectros de Mössbauer de diversos estados de oxidação da nova proteína de ferro enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (150 K).	242
Figura VII.17 - Modelo proposto para os diferentes estados de oxidação da nova proteína de ferro-enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	245
Figura VII.18 - Espectros de Mössbauer de diversos estados de oxidação da nova proteína de ferro enxofre isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (4.2 K).	249
Figura A.1 - Recta de calibração obtida para a determinação de proteína efectuada pelo método de Lowry.	261
Figura A.2 - Recta de calibração obtida para a determinação de ferro efectuada pelo método do TPTZ.	263
Figura A.3 - Cromatograma tipo resultante da análise de ácidos aminados.	267
Figura A.4 - Esquema da célula de titulação para UV-visível utilizada.	272
Figura A.5 - Esquema da célula de titulação para RPE/Mössbauer utilizada.	274
Figura A.6 - Espectro de Mössbauer do ferro metálico.	277

Índice de Tabelas

Tabela II.1. Alguns exemplos de proteínas que contêm agregados de ferro enxofre.	44
Tabela II.2. Máximos de absorção no espectro de visível para agregados de ferro-enxofre.	48
Tabela II.3. Potenciais de oxidação-redução representativos dos agregados de ferro-enxofre.	49
Tabela II.4. Valores de g de alguns agregados de ferro-enxofre.	51
Tabela II.5. Parâmetros usados para simular os espectros de Mössbauer de proteínas de ferro-enxofre.	53
Tabela III.1. Exemplos de proteínas que contêm centros binucleares de ferro com um átomo de oxigênio como ligando de ponte.	72
Tabela III.2. Classes de redutases de ribonucleotídeos.	78
Tabela III.3. Propriedades físicas das mono-oxigenases do metano.	83
Tabela III.4. Potenciais redox do centro binuclear para hidroxilases de duas diferentes mono-oxigenases do metano.	86
Tabela III.5. Determinação do conteúdo em ferro de diversas proteínas contendo centros binucleares μ -oxo.	91
Tabela III.6. Máximos de absorvância no espectro de UV-visível de diversas proteínas contendo centros binucleares μ -oxo.	92
Tabela III.7. Valores de g obtidos por RPE para diferentes estados de oxidação de diversas proteínas contendo centros binucleares μ -oxo.	94
Tabela III.8. Parâmetros obtidos pela Espectroscopia de Mössbauer para diferentes estados de oxidação de diversas proteínas contendo centros binucleares μ -oxo.	95
Tabela IV.1. Composição de ácidos aminados da Desulforedoxina sintética.	108
Tabela IV.2. Características bioquímicas e espectroscópicas da Desulforedoxina sintética. Comparação com a proteína isolada de <i>D. gigas</i> .	116

Tabela V.1. Valores obtidos para diferentes determinações do conteúdo em ferro da rubreritina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	131
Tabela V.2. Composição de ácidos aminados da rubreritina (<i>D.d.</i> 27774). Comparação com a composição obtida para a rubreritina de <i>D. vulgaris</i> estirpe Hildenborough.	134
Tabela V.3. Parâmetros usados para simulação do espectro de RPE da forma semi-reduzida da rubreritina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 (4.2 K).	137
Tabela V.4. Parâmetros obtidos do ajuste da curva de dependência da intensidade do sinal a $g = 1.76$ com a potência da micro-onda aplicada.	142
Tabela V.5. Parâmetros usados para simulação do espectro de Mössbauer dos estados totalmente oxidado dos centros presentes na rubreritina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774. Comparação com a proteína homóloga de <i>D. vulgaris</i> .	144
Tabela V.6. Parâmetros obtidos por ajuste do espectro de Mössbauer da rubreritina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 após redução com ditionito de sódio. Comparação com os parâmetros obtidos para a rubreritina de <i>D. vulgaris</i> .	150
Table VI.1. Valores obtidos para a determinação do conteúdo em ferro da desulfoferrodoxina.	163
Tabela VI.2. Composição de ácidos aminados da desulfoferrodoxina. Comparação com a composição obtida para o produto do gene Rbo de <i>D. vulgaris</i> estirpe Hildenborough.	164
Tabela VI.3. Péptidos resultantes da análise feita por computador (PCGENE) dum hipotético corte com BrCN do produto do gene rbo (<i>D. vulgaris</i>).	165
Tabela VI.4. Valores estimados para o coeficiente de extinção molar a diversos comprimentos de onda.	170
Tabela VI.5. Valores de g obtidos para um sistema com três doubletos de Kramer ($S=5/2$), com $D = -1.37 \text{ cm}^{-1}$ e $E/D = 0.28$.	184

Tabela VI.6. Parâmetros usados para efectuar a simulação das duas espécies maioritárias resultantes da adição de KCN à Dfx.	189
Tabela VI.7. Parâmetros usados nas simulações dos espectros de Mössbauer dos diversos estados de oxidação dos dois centros da Desulfoferrodoxina (4.2 K).	195
Tabela VI.8. Estados de oxidação dos centros nas diversas formas da Desulfoferrodoxina.	202
Tabela VII.1. Compostos inorgânicos contendo agregados com 6, ou mais, átomos de ferro.	212
Tabela VII.2. Valores obtidos para diferentes determinações do conteúdo em ferro da nova proteína de ferro- enxofre.	217
Tabela VII.3. Composição de ácidos aminados da nova proteína isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	218
Tabela VII.4. Energias e valores de g para os cinco doubletos de Kramer dum sistema com spin igual a 9/2 e E/D=0.062.	225
Tabela VII.5. Energias e valores de g para os doubletos de Kramer de um sistema com spin igual a 3/2.	229
Tabela VII.6. Parâmetros hiperfinos usados para simular os seis sítios do agregado paramagnético obtido a 1.5 K.	240
Tabela VII.7. Parâmetros obtidos dos ajustes dos espectros de Mössbauer adquiridos a alta temperatura.	247
Tabela VII.8. Percentagens usadas para ajustar os espectros de Mössbauer obtidos a altas temperaturas.	248
Tabela A.1a. Volumes necessários de cada solução stock em função da percentagem de acrilamida do gel separador.	258
Tabela A.1b. Volumes necessários de cada solução stock em função da percentagem de acrilamida do gel concentrador.	258
Tabela A.2. Soluções stock para géis de poliacrilamida na presença de 1% de SDS.	259
Tabela A.3. Soluções stock para a determinação de proteína pelo (Lowry).	260
Tabela A.4. Reagentes necessários para a determinação de ferro pelo método do TPTZ.	262

Tabela A.5. Composição do meio de crescimento usado para <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774.	265
Tabela A.6. Percentagens para a mistura das soluções A (fosfato de potássio monobásico) e B (fosfato de potássio dibásico) em função do pH.	269
Tabela A.7. Preparação do tampão Tris HCl. Volumes de HCl a adicionar em função do pH do tampão.	270
Tabela A.8. Valores de potencial de oxidação-redução a pH 7.0 para mediadores usados em titulações potenciométricas.	275

Nota introdutória

Esta tese encontra-se dividida em duas partes. A primeira parte, engloba os três primeiros capítulos e faz uma introdução aos temas a discutir. Assim, no capítulo I apresenta-se uma descrição sucinta da posição e importância das bactérias redutoras de sulfato na natureza. Porque todas as proteínas caracterizadas nesta tese foram isoladas de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, discutem-se também outras proteínas isoladas desta estirpe. No capítulo II e III descrevem-se, respectivamente, os tipos de centros de ferro-enxofre e centros binucleares μ -oxo já caracterizados. O objectivo destes capítulos é proporcionar a informação necessária às discussões efectuadas nos capítulos seguintes. Embora a abordagem do tema seja feita sob uma perspectiva estrutural, tenta-se ao mesmo tempo dar a conhecer a importância destes tipos de centros na natureza. Na segunda parte da tese (capítulos IV, V, VI e VII) descrevem-se e discutem-se os dados experimentais obtidos. O capítulo IV descreve a síntese total da desulforedoxina. No capítulo V, VI e VII descrevem-se as caracterizações bioquímicas e espectroscópicas da rubreritrina, da desulfoferrodoxina e de uma nova proteína de ferro-enxofre. De modo a evitar repetições desnecessárias e a facilitar a leitura, reuniu-se no apêndice A toda a metodologia experimental utilizada em dois, ou mais, dos quatro últimos capítulos.

Capítulo I.

AS BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO.

I. As bactérias redutoras de sulfato.	1
1. Introdução.	3
2. Filogenia das bactérias redutoras de sulfato.	3
3. Importância ecológica.	6
4. Importância económica.	7
5. Algumas proteínas isoladas de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774	8
5.1. Citocromos	8
5.2. Proteínas de transporte electrónico.	9
5.3. Hidrogenase.	9
5.4. Enzimas envolvidas na redução dissimilativa do sulfato.	10
5.5. Desidrogenases e redutases.	10
6. Bibliografia	12

1.1 Introdução.

Até ao princípio dos anos 80 apenas dois géneros de bactérias redutoras de sulfato eram conhecidos: o género *Desulfovibrio* (Gram-negativo) e o género *Desulfotomaculum* (Gram-positivo, esporulentas). Nas últimas duas décadas verificaram-se grandes progressos na metodologia de isolamento e manutenção das estirpes de BRS. Estão hoje espalhadas por mais de doze diferentes famílias pertencentes aos domínios *Bacteria* e *Archaea*.¹ Estas bactérias têm vindo a ganhar importância quer a nível económico quer a nível ambiental graças aos avanços que têm sido feitos na sua caracterização.

1.2 Filogenia das bactérias redutoras de sulfato.

Nas última década a área da sistemática bacteriana tem sofrido grandes alterações devido à aplicação de novas técnicas para comparação das diferentes espécies bacterianas. As BRS não foram excepção. Anteriormente as BRS eram consideradas como pertencentes a uma colecção algo restrita cujas características base eram a produção de hidrogénio e a redução de sulfato. A morfologia bacteriana, ao contrário dos animais e plantas, é pouco complexa e portanto não suficientemente detalhada para definir uma filogenia. As tentativas de caracterização usando a fisiologia bacteriana foram também infrutíferas pois estas características são muito limitadas. Se é verdade que as características fenotípicas são bons indicadores das relações, pois no caso de fenótipos complexos (p.e. fotossíntese) é pouco provável que tenham evoluído duas (ou mais) vezes durante a evolução, também é verdade que estas mesmas características são falíveis. Foi portanto essencial encontrar técnicas que pudessem ser usadas com maior sucesso. Um processo que se tem revelado bastante útil é o uso da informação genotípica, ou seja a informação presente nas sequências das proteínas e dos ácidos nucleicos. Esta informação é mais rápida de obter e mais precisa pois conceitos como similaridade são possíveis de "quantificar". O facto das técnicas de isolamento e sequenciação de ácidos nucleicos (em particular de pequenas subunidades de RNA ribossomal - rRNA) e de proteínas terem evoluído substancialmente nos últimos anos fez com que o uso de sequências fosse possível. Este avanço tecnológico permitiu utilizar as

sequências das moléculas de 16S rRNA para avaliar a evolução bacteriana.² Tornou-se, portanto, possível conhecer mais profundamente as relações de similaridade entre as diversas espécies de BRS.

A redução dissimilativa de sulfato é provavelmente um processo com uma origem bastante remota na evolução, pois pode ser encontrada em duas linhas evolutivas primárias. Representantes das BRS estão presentes em dois, dos três, domínios existentes: *Bacteria* e *Archaea*¹ (ver figura I1). Os representantes deste último domínio, pertencentes ao género *Archaeoglobus*, foram isolados de fontes hidrotérmicas na proximidade de vulcões e possuem a capacidade de crescer entre 80 e 110 °C.³ Foi ainda demonstrada a capacidade de algumas estirpes para crescerem na presença de crude (talvez devido à presença de quantidades vestigiais de acetato). Este género foi incluído no reino *Euryarchaeota* juntamente com os organismos metanogénicos e halofílicos.¹ No entanto esta classificação poderá vir a ser revista, pois o conjunto de diversas características (como a presença e/ou ausência de certos cofactores) parecem indicar que estas bactérias são representantes de uma linha filogenética intermediária entre o referido reino e o reino *Crenarchaeota* (bactérias termofílicas redutoras de enxofre).^{3,4}

No domínio *Bacteria* as BRS estão presentes em dois reinos. No reino das bactérias Gram-positivas existe um género (*Desulfotomaculum*) de bactérias esporulentas com a capacidade de efectuar a redução dissimilativa do sulfato.⁵ Apesar de ser por vezes difícil efectuar a reacção de Gram nas condições de crescimento normais destas bactérias, análises de microscopia electrónica verificaram que a parede celular é constituída por uma monocamada à semelhança das outras bactérias Gram-positivas. A diversidade dentro deste género é grande (apenas 83% de semelhança entre as sequências dos 16S rRNA de *Desulfotomaculum orientis* e *Desulfotomaculum ruminis*). Devido ao facto de a maioria dos esforços de investigação terem estado orientados para as BRS não esporulentas, pensa-se que a diversidade do género *Desulfotomaculum* na natureza deve ser considerável e que muitas novas estirpes estão ainda por isolar.

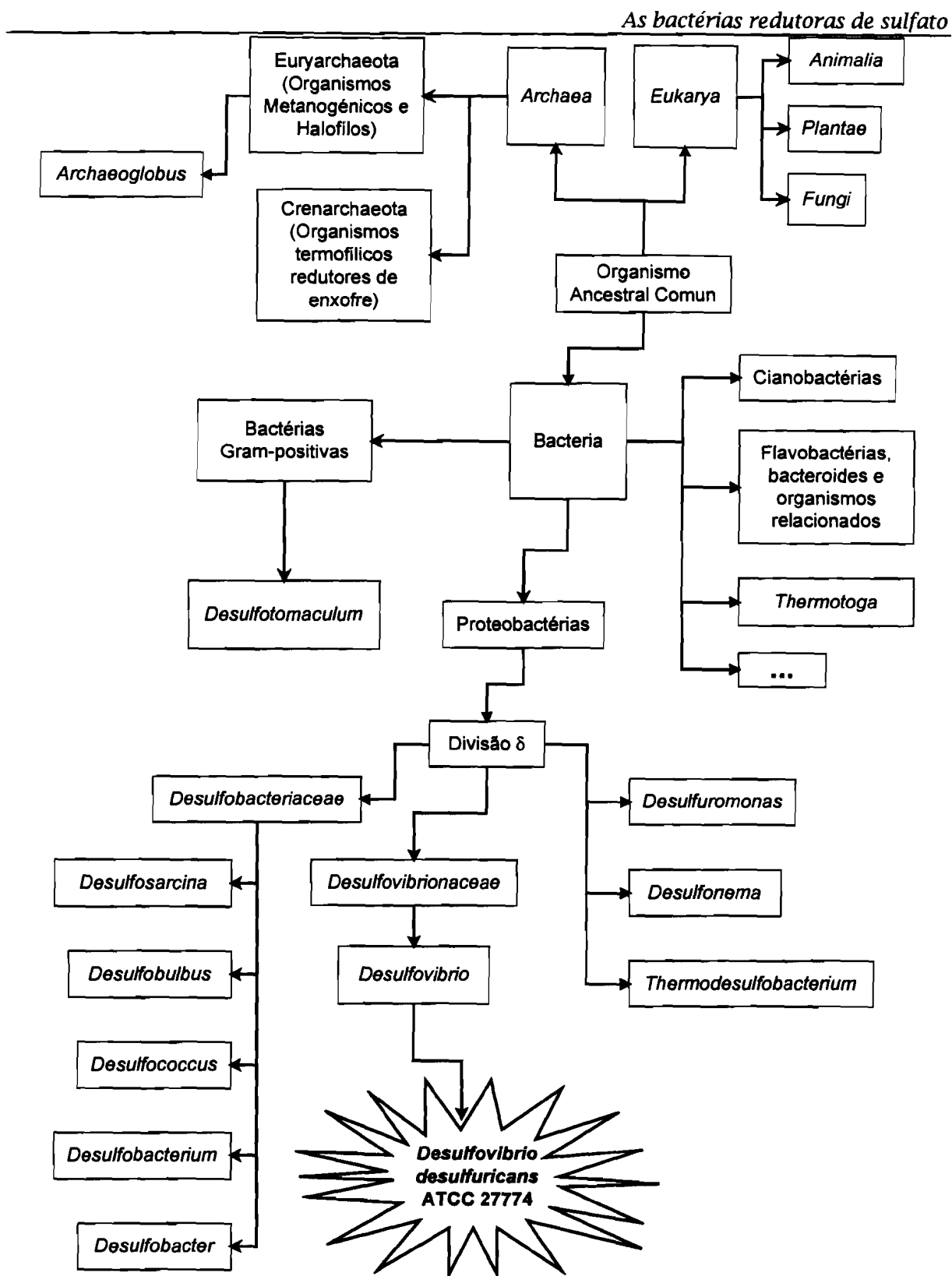


Figura I.1 - Posição filogenética dos diversos géneros de bactérias redutoras de sulfato na natureza (Nota: a distância entre as categorias taxonómicas não é representativa da distância filogenética).

As BRS Gram-negativas e não esporulentas encontram-se agrupadas na subdivisão δ das proteobactérias (ou bactérias púrpuras) juntamente com as mixobactérias e os bedelovibrios. Foi já proposta uma subdivisão destas BRS em duas famílias. A família *Desulfovibrionaceae*⁶ reuniria a maioria das espécies pertencentes ao género *Desulfovibrio*, enquanto que os géneros *Desulfosarcina*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium* e *Desulfobacter* seriam reunidos na família *Desulfobacteriaceae*.⁷ No entanto, esta divisão não é completa pois ficariam ainda por contemplar os géneros *Desulfonema*, *Thermodesulfobacterium* e *Desulfuromonas*.

O género *Desulfovibrio* foi inicialmente criado para agrupar as espécies de BRS que não produzem esporos, continham citocromo c_3 e desulfovirdina, e utilizavam lactato e hidrogénio como dadores electrónicos.⁸ É de entre todos os géneros de BRS Gram-negativas o que contém o maior número de espécies isoladas. Como é possível verificar na figura I.1 existem essencialmente cinco linhas evolutivas principais que permitem distinguir as diferentes espécies de *Desulfovibrio*. É numa dessas linhas que está contida a estirpe *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 juntamente com as estirpes *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough e *Desulfovibrio piger*. A comparação das sequências parciais dos rRNA 16S e 23S de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 com *Desulfovibrio "multispirans"* e *Desulfovibrio desulfuricans* Essex 6 revelou que estas estirpes estão fortemente relacionadas entre si.⁶ Com efeito, de entre as BRS classificadas estas três estirpes partilham a característica única de poderem crescer num meio de lactato utilizando o nitrato como aceitador final de electrões.

1.3 Importância ecológica.

Como responsáveis pela redução do sulfato a sulfureto ou enxofre, as BRS são uma parte importante do ciclo do enxofre. As BRS podem fazer parte de diferentes tipos de ecossistema. Com efeito, elas podem existir no penúltimo estado de um ambiente poluído.⁸ Num primeiro estado a população bacteriana é dominada pela presença de organismos aeróbicos fermentativos. Como consequência do metabolismo destes organismos dá-se o

desaparecimento do oxigénio e a produção de diversos compostos parcialmente oxidados resultantes da fermentação. Se no meio existir sulfato, as BRS serão então dominantes na constituição da população bacteriana. As BRS encarregam-se de baixar o potencial do meio (que atinge valores negativos) através da produção de sulfureto e contribuindo assim para a anaerobicidade do meio. Por fim, quando o sulfato se torna inexistente os organismos metanogénicos completam o processo, produzindo dióxido de carbono e metano. Mas as BRS possuem um papel activo em ambientes não poluídos. Um exemplo é o caso dos pântanos, nos quais mais de metade da decomposição total é devida à redução do sulfato.⁹ Nestes ecossistemas, o dióxido de carbono é fixado pelas plantas superiores. A biomassa assim produzida é degradada por uma grande variedade de organismos eucarióticos e uma grande parte é oxidada a dióxido de carbono e água por microrganismos aeróbicos. No entanto, uma parte significativa é oxidada à forma de ácidos orgânicos e alcoóis por organismos fermentativos heterotróficos. Estes compostos são então utilizados pelas BRS como substratos no metabolismo de respiração anaeróbica do sulfato, produzindo acetato, dióxido de carbono e sulfureto. Algumas BRS podem acoplar a oxidação do acetato a dióxido de carbono com a redução do sulfato. O acetato pode ainda ser utilizado pelas bactérias metanogénicas para produção de dióxido de carbono e metano.

1.4 Importância económica.

Devido à sua presença em poços de petróleo as BRS tornaram-se extraordinariamente importantes na indústria petrolífera.¹⁰ As BRS são responsáveis por diversos problemas, tais como a corrosão da maquinaria de perfuração e bombeamento, e tanques de armazenamento. Por sua vez, a contaminação do crude (com a consequente produção de sulfuretos) leva ao aumento do teor em enxofre. Mas a corrosão provocada pelas BRS torna-se ainda mais importante nas condutas ("pipelines") e tanques subterrâneos onde as perdas ascendem a vários biliões de escudos por ano. Diversas outras indústrias são também afectadas pela presença de BRS que, devido à produção de sulfureto, causam a precipitação do ferro que conduz ao escurecimento e descoloração de diversos produtos.⁹

Algumas estirpes termofílicas de *Desulfotomaculum* (produtoras de esporos resistentes a altas temperaturas) podem também causar deterioração de produtos alimentares.^{11,12}

1.5 Algumas proteínas isoladas de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774

Nos capítulos V, VI e VII descreve-se o isolamento e caracterização de três proteínas (rubreritrina, desulfoferrodoxina e uma nova proteína de ferro-enzofre) isoladas de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. No entanto, foram já isoladas desta estirpe de BRS cerca de duas dezenas de proteínas. De seguida faz-se uma descrição sumária dessas proteínas.

1.5.1 Citocromos

Tal como em muitas outras estirpes de *Desulfovibrio*, foi possível isolar o **citocromo c_3** .¹³ Este citocromo é tetrahémico, tendo sido isolado na forma monomérica (13.5 kDa). Pensa-se que o citocromo c_3 tenha como função mediar a transferência electrónica entre a hidrogenase e outros transportadores electrónicos, como por exemplo a ferredoxina. Dois outros citocromos multihémicos foram purificados a partir de extratos de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 crescidos na presença de nitrato como único aceitador electrónico final. O **citocromo cc_3** ¹³ (dodecahémico) é um monómero de massa molecular igual a 40.8 kDa, enquanto que o **citocromo "Split solet"**¹³ apresenta-se na forma dimérica (2 x 26.36 kDa) contendo dois hemos por cadeia polipeptídica. Estes dois últimos citocromos não possuem qualquer analogia com outros citocromos do tipo *c* isolados de BRS e a sua função é ainda desconhecida. É no entanto interessante notar a grande diversidade e quantidade de sistemas multihémicos do tipo *c* existentes nesta bactéria. Para além destes sistemas, foi ainda isolado um **citocromo monohémico**¹⁴ cuja sequência N-terminal apresenta alguma homologia com o citocromo c_{553} isolado de *D. vulgaris* Hildenborough.

1.5.2. Proteínas de transporte electrónico.

Três proteínas não hémicas, partilhando a função de transporte electrónico foram isoladas de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. A **flavodoxina**¹⁵ contém um grupo FMN associado a uma cadeia polipeptídica com a massa molecular aproximadamente igual a 16 kDa. Esta proteína partilha grande homologia com outras flavodoxinas isoladas de BRS. Com efeito, a flavodoxina menos homóloga (isolada de *D. gigas*) possui 44.5% de identidade, tendo-se obtido um valor igual a 75.3% para a mais homóloga (isolada de *D. desulfuricans* 29577). A **ferredoxina**¹⁶ isolada é um monómero de 6 kDa. Dados preliminares obtidos através da espectroscopia de RPE indicam a existência de dois agregados de [4Fe-4S] por cadeia polipeptídica. A **rubredoxina**¹⁷ deste organismo foi também isolada e a estrutura terciária determinada por cristalografia de raios-X. Comparativamente a outras rubredoxinas, esta proteína possui uma massa molecular inferior (aproximadamente 5.4 kDa).

1.5.3 Hidrogenase.

As hidrogenases são constituídas por um grupo heterogénio de proteínas que catalizam a oxidoredução do hidrogénio molecular. As diversas espécies de *Desulfovibrio* possuem três diferentes tipos de hidrogenase, dependentes da composição dos grupos prostéticos: *i*) apenas agregados de ferro-enxofre; *ii*) presença de um centro mononuclear de níquel e *iii*) presença de selénio. A **hidrogenase**^{18,19} isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 pertence ao segundo destes grupos. Esta proteína é constituída por duas subunidades (30 e 60 kDa) e possui um centro mononuclear de níquel, um agregado do tipo [3Fe-4S] e dois agregados do tipo [4Fe-4S]. Estas hidrogenases revelam-se bastante resistentes à inibição por CO e NO. No entanto o acetileno é um forte inibidor da actividade. São também inactivadas reversivelmente pelo oxigénio, necessitando de um longo período de incubação (anaerobiose/incubação com hidrogénio) para readquirirem a capacidade catalítica.

I.5.4. Enzimas envolvidas na redução dissimilativa do sulfato.

A **redutase do APS**²⁰ é a segunda das três enzimas participantes no importante processo de redução dissimilativa do sulfato. Após a relativamente inerte molécula de sulfato ter sido activada pela sulfurilase do ATP, a molécula de APS é reduzida a sulfito pela redutase do APS. Esta enzima é constituída por quatro subunidades ($\alpha_2\beta_2$), possuindo uma massa molecular igual a 170 kDa. Como cofactores a enzima possui uma unidade de FAD e dois agregados do tipo [4Fe-4S]. No passo seguinte, o sulfito é reduzido a sulfureto pela acção da **desulfovirdina**²¹ (ou redutase do sulfito). O mecanismo de catálise é ainda controverso. A hipótese da redução ser efectuada num só passo opõe-se a hipótese da existência de intermediários (tritrionato e tiosulfato) durante a redução. Estudos preliminares revelam que a desulfovirdina isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 é uma redutase de sulfito de alto peso molecular (provavelmente com a composição de subunidades $\alpha_2\beta_2\gamma_2$) e de spin alto. Este tipo de enzimas possui dois sirohemos de alto spin ($S = 5/2$) e quatro agregados do tipo [4Fe-4S] (com a existência de acoplamento entre os sirohemos e dois dos agregados de [4Fe-4S]). Não é de excluir a possibilidade, já observada em desulfovirdinas isoladas de outras estirpes de *Desulfovibrio*,²² de após o procedimento de purificação existir uma percentagem de moléculas nas quais as tetrahidroporfirinas não contêm ferro.

I.5.5. Desidrogenases e redutases.

A **desidrogenase do formato**²³ purificada dos extratos celulares de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 é uma enzima trimérica com a massa molecular de 143 kDa (88.3, 28.8 e 16.4 kDa). Esta enzima contém quatro grupos hémicos do tipo c, um centro mononuclear de molibdénio e agregados de ferro- enxofre (dados provenientes da espectroscopia de Mössbauer indicam a presença de dois agregados do tipo [4Fe-4S]).

A **redutase do nitrato**²⁴ de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 é uma enzima hexahémica cuja massa molecular é igual a 65 kDa. Esta enzima foi possível de isolar após se efectuar o crescimento bacteriano usando um meio de lactato e nitrato (sendo este o único aceitador terminal de electrões presente). Contrariamente às outras proteínas isoladas desta

estirpe, a redutase do nitrito parece ter uma localização transmembranar na célula. Estudos de Mössbauer revelaram que esta enzima possui um hemo no estado de spin alto ($S = 5/2$) e os restantes cinco hemo no estado de spin baixo ($S = 1/2$).

À semelhança da proteína isolada de *D. gigas*, a **oxidoreductase do aldeído**²⁵ isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 é uma proteína dimérica (200 kDa) que possui dois tipos de grupos prostéticos: um centro de molibdénio (molibdopterina) e dois agregados do tipo [2Fe-2S].

Finalmente, existe uma outra proteína isolada desta estirpe que foi caracterizada como sendo uma **oxidoreductase da rubreritrina**²⁶ dependente de NADH. Esta proteína contém apenas um grupo FAD por cadeia polipeptídica (41 kDa). Para além da capacidade de reduzir a rubreritrina na presença de NADH, esta proteína pode utilizar outros aceitadores electrónicos tais como o citocromo c, a mioglobina e ferricianeto de potássio.

1.6 Bibliografia.

1. Woese, C.R., Kander, O., e Wheelis, M.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579.
2. Woese, C.R. (1987) *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
3. Stetter, K.O., Lauerer, G., Thomm, M., e Neuner, A. (1987) *Science* **236**, 822-824.
4. Achenbach-Richter, L., Stetter, K.O., e Woese, C.R. (1987) *Nature* **327**, 348-349.
5. Campbell, L.L., e Postgate, J.R. (1965) *Bacteriological Reviews* **29**, 359-363.
6. Devereux, R., He, S.-H., Doyle, C.L., Orkland, S., Stahl, D.A., LeGall, J., e Whitman, W.B. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 3609-3619.
7. Widdel, F., e Bak, F. (1991) *"The Prokaryotes"* **1**, 3352-3378.
8. Postgate, J.R. (1984) *"The Sulphate-Reducing Bacteria"*, 2ª edição, University Press, Cambridge.
9. Singleton, R., Jr. (1993) *"The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives"* (Odom, J.M., e Singleton, R., Jr., ed.) Springer-Verlag, 1-20.
10. Odom, J.M. (1993) *"The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives"* (Odom, J.M., e Singleton, R., Jr., ed.) Springer-Verlag, 189-210.
11. Lin, C.C., e Lin, K.C. (1970) *App. Microbiol.* **19**, 283-286.
12. Donnelly, L.S., e Busta, F.F. (1980) *App. Env. Microbiol.* **40**, 721-725.
13. Liu, M.-C., Costa, C., Coutinho, I.B., Moura, J.J.G., Moura, I., Xavier, A.V., e LeGall, J. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 5545-5551.
14. Costa, C., LeGall, J., Moura, J.J.G., e Moura, I. (1990) *"Italian-Portuguese-Spanish Meeting in Inorganic Chemistry Poster Abstracts"*, 217.
15. Caldeira, J., Palma, P.N., Regalla, M., Lampreia, J., Calvete, J., Schäfer, W., LeGall, J., Moura, I., e Moura, J.J.G. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **220**, 987-995.
16. Macedo, A.L. e colaboradores. Trabalho não publicado.

17. Sieker, L.C., Stenkamp, R.E., Jensen, L.H., Prickril, B., e LeGall, J. (1986) *FEBS Lett.* **208**, 73-76.
18. Krüger, H.-J., Huynh, B.H., Ljungdahl, P.O., Xavier, A.V., DerVartanian, D.V., Moura, I., Peck, H.D., Jr., Teixeira, M., Moura, J.J.G., e LeGall, J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 14620-14623.
19. Franco, R., Moura, I., LeGall, J., Peck, H.D., Jr., Huynh, B.H., e Moura, J.J.G. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1144**, 302-308.
20. Lampreia, J., Pereira, A.S., e Moura, J.J.G. (1994) *Methods in Enzymology*, "Inorganic Sulfur Metabolism", *em impressão*.
21. Pereira, A.S. e colaboradores, Trabalho não publicado.
22. Moura, I., LeGall, J., Lino, A.R., Peck, H.D., Jr., Fauque, G., xavier, A.V., DerVartanian, D.V., Moura, J.J.G., e Huynh, B.H. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1075-1082.
23. Costa C., Moura, I., Teixeira, M., LeGall, J., e Moura, J.J.G. (1993) *J. Inorg. Biochem.* **51**, 372.
24. Costa, C., Moura, J.J.G., Moura, I., Liu, M.Y., Peck, H.D., Jr., LeGall, J., Wang, Y., e Huynh, B.H. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 14382-14387.
25. Duarte, R.O., Barata, B.A.S., LeGall, J., Moura, I., e Moura, J.J.G. (1993) 9º Congresso Nacional de Bioquímica, Sociedade Portuguesa de Bioquímica, Livro de Resumos, 124.
26. Saint-Martin, P., Galliano, N., Fauque, G., Moura, I., Moura, J.J.G., e LeGall, J. (1987) *Flavins and Flavoproteins* (Walter de Gruyter & Co.), 349.

Capítulo II.

CENTROS DE FERRO-ENZOFRE.

II. Centros de Ferro-Enxofre	15
1. Introdução.	17
2. Centros do tipo FeS_4 .	17
2.1. Rubredoxinas.	20
2.2. Desulforedoxina.	22
3. Agregados de $[\text{2Fe-2S}]$.	23
3.1. Agregados do tipo $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$	23
3.2. Agregados do tipo "Rieske"	25
4. Agregados de $[\text{4Fe-4S}]$.	27
5. Agregados de $[\text{3Fe-4S}]$.	31
6. Interconversão entre $[\text{3Fe-4S}]$ e $[\text{4Fe-4S}]$.	33
7. Agregados heterometálicos do tipo $[\text{M},\text{3Fe-4S}]$	33
8. Agregados com estequiometria superior.	34
8.1. A nitrogenase	34
8.2. As hidrogenases de ferro	40
8.3. As redutases do sulfito	41
9. O agregado de $[\text{xFe-4S}]$ como elemento regulador da função enzimática.	42
10. Bibliografia	57

II.1. Introdução.

A classe de metaloproteínas melhor estudada e caracterizada na natureza é, sem dúvida, a que engloba as proteínas designadas por proteínas hémicas. Estas proteínas contêm como grupos prostéticos diferentes tipos de porfirinas que na maioria dos casos ligam átomos de ferro. Por oposição, as metaloproteínas que não contêm grupos hémicos são designadas por "proteínas não hémicas". Estas últimas foram injustamente consideradas durante muito tempo como um grupo de proteínas com massa molecular baixa e limitado a reacções de transferência electrónica. Neste e no próximo capítulo faz-se uma abordagem introdutória a dois grupos (proteínas de ferro-enxofre e proteínas contendo centros binucleares de ferro μ -oxo) pertencentes à família das proteínas não hémicas. Algumas das enzimas descritas são de extraordinária importância em diversos processos metabólicos, como sejam o ciclo de Krebs, a fotossíntese, a cadeia respiratória e a síntese e reparação de DNA.

As proteínas de ferro-enxofre são assim designadas por possuírem centros, ou agregados, que são constituídos por átomos de ferro associados a enxofre lábil (S^{2-}) e/ou resíduos de cisteínas. Sabe-se hoje que, longe do restrito papel de transferência electrónica, estas proteínas possuem actividade enzimática e/ou regulatória.

II.2. Centros do tipo $FeCis_4$.

O mais simples centro de ferro-enxofre que podemos encontrar é o centro do tipo $FeCis_4$. Este tipo de centro consiste simplesmente num átomo de ferro coordenado a quatro resíduos de cisteína. Mesmo num caso de coordenação tão simples são conhecidas duas variantes na geometria dessa coordenação, o que implica a existência de algumas propriedades fisico-químicas diferentes.

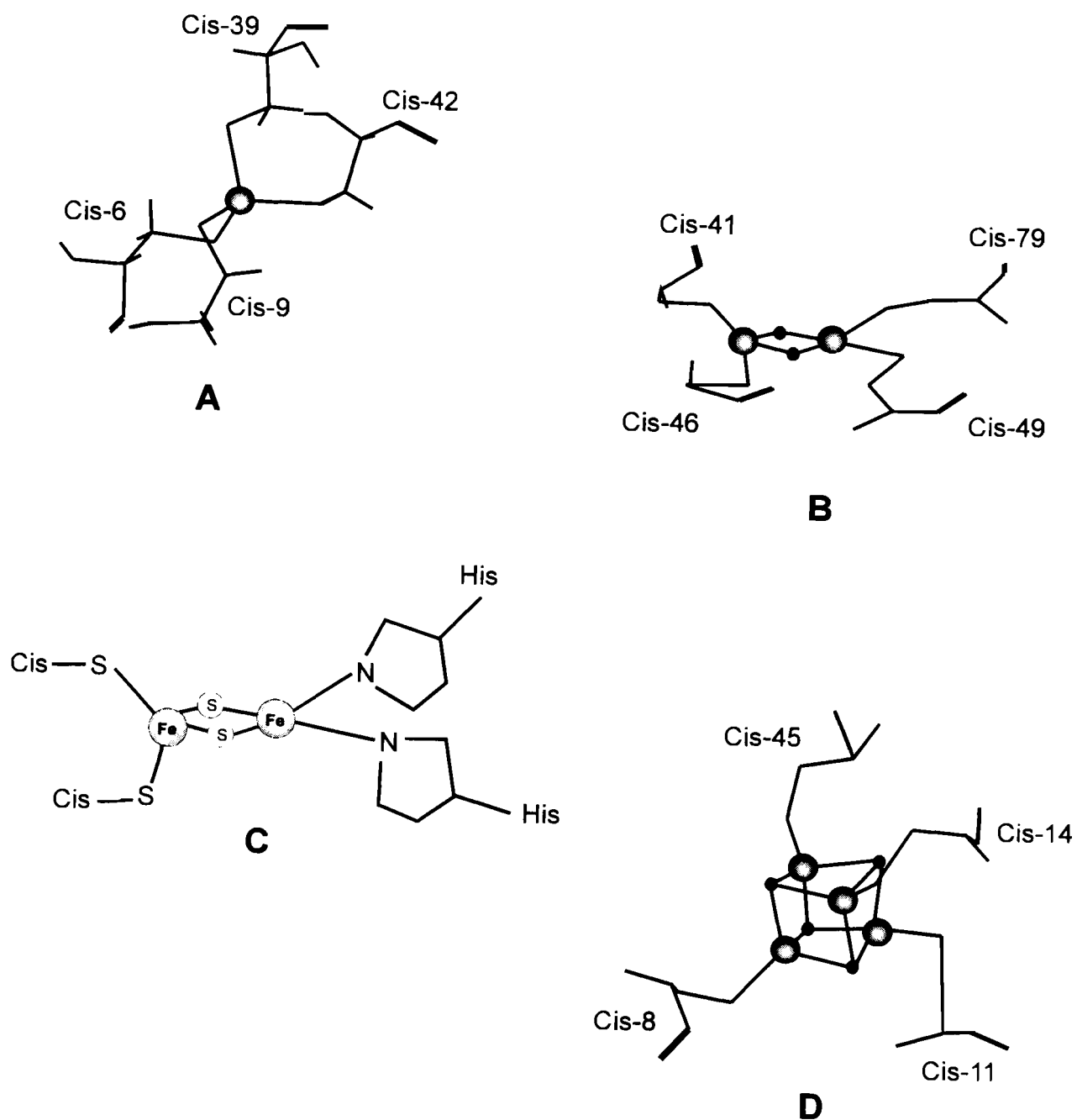


Figura II.1 - Estruturas de diferentes agregados de ferro-enzofre: (A) FeCis_4 (Rubredoxina de *C. pasteurianum*); (B) $\text{Fe}_2\text{Cis}_2\text{S}_2$ (Ferredoxina de *S. platensis*); (C) "Rieske" (estrutura proposta de acordo com diversos dados espectroscópicos); (D) $[\text{4Fe-4S}]$ (Ferredoxina de *P. aerogenes*).

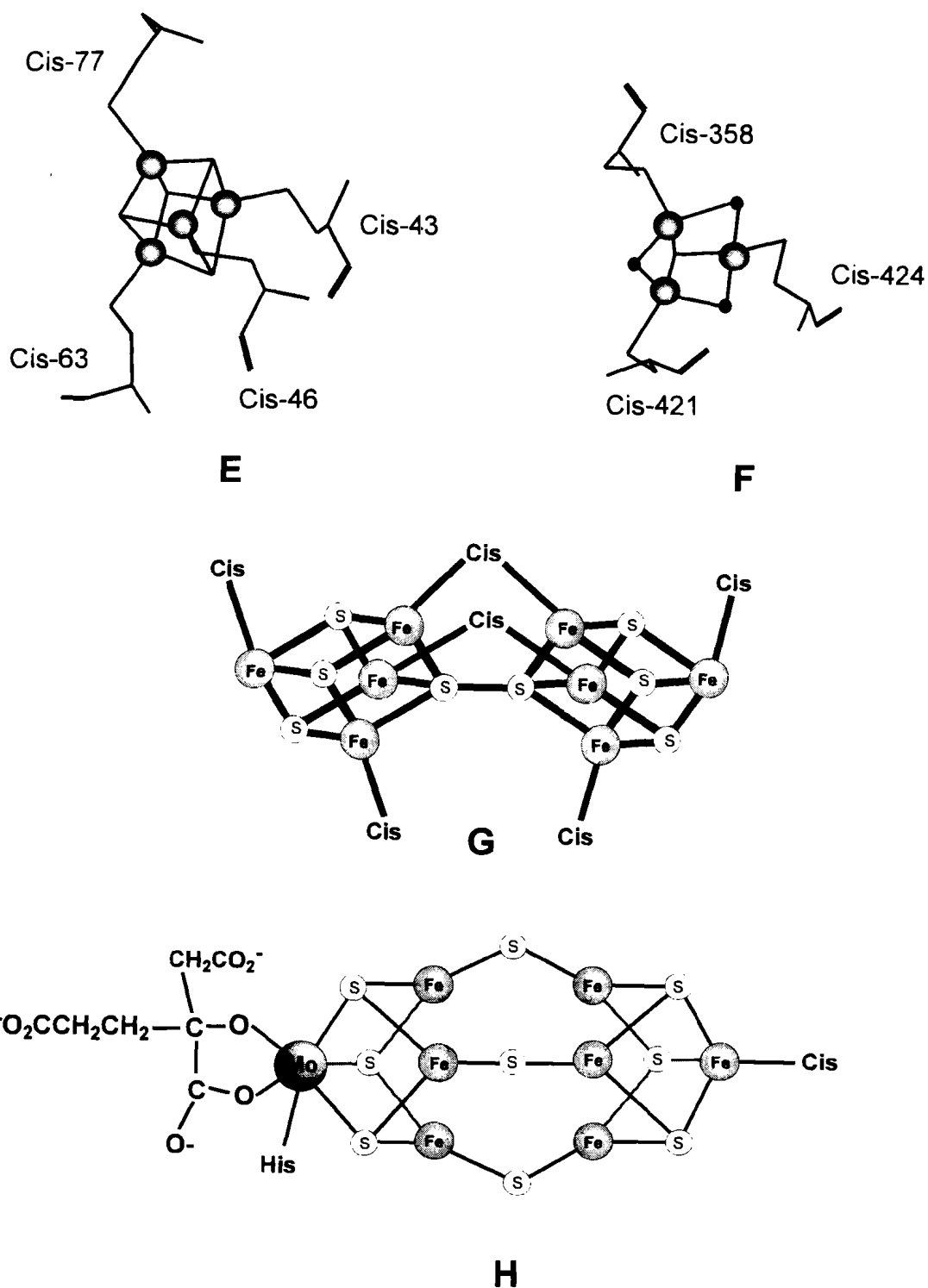
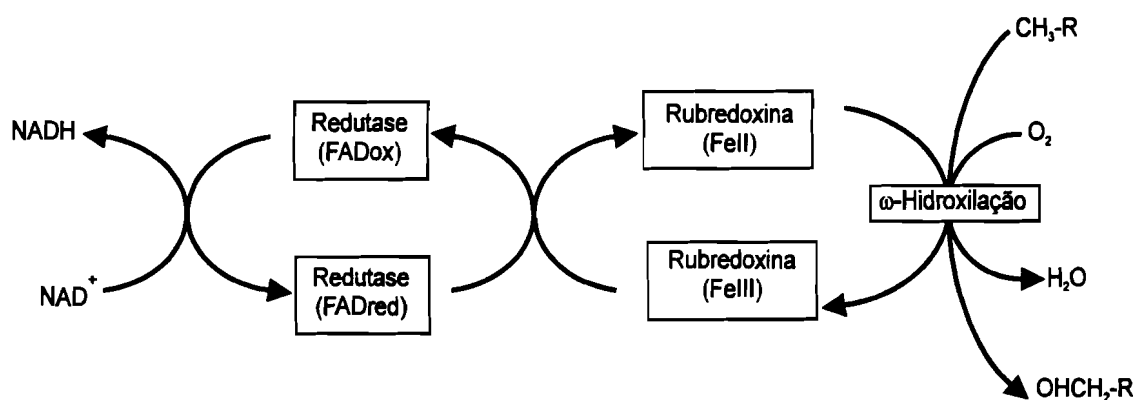


Figura II.1 (continuação) - Estruturas de diferentes agregados de ferro-enzofre: (E) HiPIP (*C. vinosum*); (F) [3Fe-4S] (Aconitase de porco, forma inactiva); (G) Agregados P da nitrogenase (modelo baseado na estrutura obtida pela cristalografia de raios-X); (H) Cofactor FeMo da nitrogenase (modelo baseado na estrutura obtida pela cristalografia de raios-X).

II.2.1. Rubredoxinas.

As rubredoxinas foram o primeiro tipo de metaloproteínas onde foi encontrado um centro do tipo FeCis_4 . Neste caso a coordenação das cisteínas ao ferro é quase tetraédrica. As rubredoxinas são proteínas monoméricas de baixa massa molecular (aproximadamente igual a 6 kDa) que contêm um centro por cadeia polipeptídica. Podem ser encontradas no citoplasma de várias bactérias anaeróbicas (*Desulfovibrio sp.*^{1,2,3,4}, *Td. commune*⁵, *Drm. acetoxidans*⁶ e *C. pasteurianum*^{7,8}).

A única excepção conhecida é a rubredoxina isolada da bactéria aeróbica *Pseudomonas oleovorans* que contém dois átomos de ferro por cadeia polipeptídica (19 kDa)^{9,10,11}. Ao contrário das outras rubredoxinas para as quais não existe uma função definida, verificou-se que esta proteína está directamente envolvida na reacção de ω -hidroxilação:

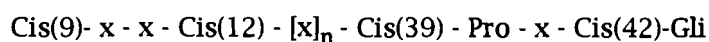


Este centro já foi caracterizado em pormenor por variadas técnicas espectroscópicas. Após a purificação em condições aeróbicas, o centro encontra-se no estado oxidado, possuindo uma cor vermelha. O espectro de visível das rubredoxinas apresenta máximos de absorvância a 492, 365 e 280 nm (ver tabela II.2). Por RPE foi possível verificar que o ferro se comporta como um ião férrico de alto spin ($S=5/2$) com $E/D=0.28$. No espectro é possível observar ressonâncias a $g=4.3$ e 9.4 , atribuídas aos doublets de kramer com $m_s = \pm 3/2$ e ao estado fundamental, respectivamente.

O espectro de Mössbauer apresenta uma espécie magnética com picos bem resolvidos, característicos de um sistema de spin semi-inteiro. A análise dos espectros adquiridos aplicando campos magnéticos elevados mostra que estamos na presença de uma espécie mononuclear.

No estado reduzido não existe contribuição na região visível do espectro.¹² O espectro de Mössbauer apresenta agora um único dobleto de quadrupolo com parâmetros típicos de ferro no estado ferroso com uma coordenação tetraédrica.¹³

Na sequência de ácidos aminados das rubredoxinas é possível encontrar o seguinte padrão comum, constituído pelas quatro cisteínas que são os ligandos do ferro:



A estrutura de diversas rubredoxinas, obtida por cristalografia de raios-X, foi já estabelecida para diferentes espécies (*C. pasteurianum*¹⁴ a 1.2 Å, *D. gigas*¹⁵ a 1.4 Å, *Desulfovibrio desulfuricans*¹⁶ a 1.5 Å e *Desulfovibrio vulgaris*¹⁷ a 1.5 Å). Estas estruturas confirmaram a coordenação tetraédrica do ferro (ver figura II.1a).

Nas espécies de *Desulfovibrio* estes centros possuem potenciais de oxidação-redução que variam entre 0 e -50 mV. Estes valores parecem anormalmente elevados se pensarmos que estas bactérias estão envolvidas na redução do sulfato em ambientes anaeróbicos. Assim a função fisiológica destas proteínas permanece desconhecida. A hipótese mais plausível é a de apenas terem uma função de transferência electrónica.

Foi possível proceder à reconstituição da rubredoxina de *D. gigas* a partir da apoproteína.¹⁸ A proteína reconstituída com ferro apresenta todas as características da proteína nativa. Esta reconstituição pode também ser feita com cobalto ou níquel¹⁹. Neste último caso, a proteína apresenta actividade de hidrogenase²⁰, possuindo um sinal de RPE semelhante ao observado nas hidrogenases que contêm níquel.²¹

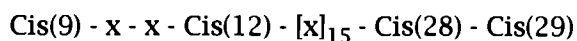
II.2.2. Desulforedoxina.

A desulforedoxina é uma proteína purificada do extracto celular de *D. gigas*²² que contém um centro muito semelhante ao das rubredoxinas. Esta proteína é um dímero de massa molecular igual a 7.9 kDa. Ambas as subunidades são iguais, cada uma constituída por 36 ácidos aminados (dos quais não fazem parte qualquer histidina, arginina, prolina, isoleucina, fenilalanina ou triptofano). A sequência desta cadeia polipeptídica foi já efectuada por sequência directa da proteína²³ e confirmada por sequência do gene que codifica para a desulforedoxina²⁴. A sequência não revela qualquer semelhança com outra proteína não hémica conhecida, com a excepção da desulfoferredoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 e da proteína análoga de *D. vulgaris*, nas quais o N-terminal apresenta uma grande homologia com a sequência da desulforedoxina (ver capítulo VI). Cada monómero contém um átomo de ferro e quatro cisteínas. Dados obtidos a partir da marcação de cisteínas com ³H revelaram que não existem cisteínas livres e que todas as existentes estão coordenadas ao átomo de ferro.²⁵

O espectro de visível da desulforedoxina apresenta grandes semelhanças com o espectro das rubredoxinas exibindo máximos a 507, 370 e 278 nm. O coeficiente de extinção molar a 507 nm tem o valor de 4580 M⁻¹cm⁻¹ (valor calculado por monómero). O espectro de RPE da proteína nativa apresenta ressonâncias a g= 7.7, 5.7, 4.1 e 1.8.²⁶ Este conjunto de ressonâncias foi atribuído a um ião férrico de spin alto (S=5/2) com E/D=0.08. O espectro de Mössbauer revela uma espécie paramagnética, monomérica cujos parâmetros são referidos na tabela II.5.

No estado reduzido o espectro de Mössbauer da desulforedoxina apresenta um único dobleto de quadrupolo com $\Delta E_Q = 3.55$ mm/s e $\delta = 0.70$ mm/s.²⁵ Os valores observados, quer para a forma oxidada, quer para a forma reduzida da desulforedoxina são quase idênticos aos atrás citados para a rubredoxina de *D. gigas*, o que indica a presença do mesmo tipo de coordenação (resíduos de cisteína, numa esfera de coordenação tetraédrica) para estas duas proteínas. No entanto, a geometria de coordenação tem que ser diferente pois o valor de E/D para a desulforedoxina (0.08) é substancialmente inferior ao da rubredoxina

(0.28) dando origem a um espectro de RPE mais axial. Esta diferença na geometria de coordenação pode ser justificada com base na diferença das sequências destas duas proteínas. Contrariamente ao observado para as rubredoxinas, duas das cisteínas que ligam o ferro estão em posição consecutiva na sequência, sendo o padrão de ligação o seguinte:



Este facto pode explicar as diferenças espectroscópicas observadas, pois é possível pensar que as cisteínas 28 e 29 possam impôr uma distorção à coordenação tetraédrica.

O potencial de oxidação-redução deste tipo de centro tem o valor de -35 mV, que se revela também bastante elevado relativamente aos valores observados para outro tipo de centros existentes de proteínas purificadas de diversas espécies de *Desulfovibrio*.

II.3. Agregados de [2Fe-2S].

II.3.1. Agregados do tipo $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$

Os agregados de $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$ podem ser encontrados numa grande diversidade de proteínas e organismos. Primeiramente identificados como cofactores das ferredoxinas de plantas²⁷ e cianobactérias, foram já encontrados em muitos outros sistemas^{28,29}. Foram também encontrados casos em que os agregados de $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$ coexistem com outros cofactores^{30,31} (ver tabela II.1).

Apesar destes agregados estarem presentes em enzimas com funções metabólicas variadas, até ao presente momento não existe evidência experimental para a participação directa dos agregados nessas funções. Nos exemplos conhecidos, verificou-se que os agregados possuem apenas um papel de transferência electrónica (intra ou intermolecular) de, ou para, o centro catalítico da enzima.

As estruturas obtidas através da cristalografia de raios-X para diferentes proteínas (na sua maioria ferredoxinas), revelam que ambos os ferros são coordenados tetraedricamente por dois resíduos de cisteína e dois átomos de enxofre lábil, com estes últimos a servir de ligandos aos dois átomos de ferros do agregado^{32,33,34} (ver figura II.1b).

Os agregados de $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$ têm dois estados de oxidação possíveis: i) estado oxidado (carga formal +2), no qual os dois ferros estão no estado férrico e ii) estado reduzido (obtido por redução monoelectrónica a partir do estado oxidado, carga formal +1), no qual um dos ferros está no estado ferroso e o outro no estado férrico. Os potenciais de meia onda são negativos, podendo variar entre os -240 mV e os -460 mV ³⁵ (ver tabela II.3).

No estado oxidado, estes agregados conferem uma cor avermelhada às proteínas. No caso das ferredoxinas que apenas possuem agregados deste tipo, o espectro de UV-visível apresenta picos de absorção máxima aproximadamente a 460, 420, 330 e 280 nm (ver tabela II.2). No estado reduzido, e contrariamente aos centros FeS_4 , não se verifica a perda total da absorvância. Estudos detalhados, utilizando a ferredoxina de espinafre e a adrenoxina, mostraram que algumas bandas existem na região de visível após a redução³⁶.

No estado reduzido, os agregados de $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$ apresentam um sinal de RPE a campo alto^{37,38}. Neste estado os ferros encontram-se fortemente acoplados antiferromagneticamente para dar origem a um spin igual a 1/2. Apesar da anisotropia e largura de linha variarem de proteína para proteína, verifica-se que dois dos valores de g são sempre inferiores ao valor do electrão livre e que o $g_{\text{médio}}$ é aproximadamente igual a 1.96 (ver tabela II.4). O forte acoplamento antiferromagnético é consequência da existência dos dois átomos de enxofre que partilham simultaneamente a ligação aos átomos de ferro. Este tipo de acoplamento permite que o dobleto correspondente ao estado fundamental esteja bem separado dos outros multipletos, o que implica que o tensor \tilde{g} possa ser expresso como uma combinação dos tensores individuais associados a cada um dos ferros. Utilizando um modelo para o campo de ligandos, Bertrand e colaboradores³⁹ mostraram que a variação nos valores de g reflete essencialmente as pequenas variações na distorção rômica do sítio ferroso.

O espectro de Mössbauer típico do estado oxidado apresenta apenas duas linhas, não possuindo resolução suficiente para se efectuar a distinção dos dois átomos de ferro do agregado.³⁸ Os parâmetros normalmente observados são os seguintes: $\Delta E_Q \approx 0.50\text{-}0.80$ mm/s e $\delta \approx 0.25\text{-}0.29$ mm/s. Por aplicação de um campo magnético elevado observa-se um espectro de três linhas, resultante dos termos relativos ao desdobramento nuclear de Zeeman,

indicando que estamos na presença de uma espécie diamagnética. Tal só pode resultar de um acoplamento antiferromagnético entre os dois ferros férricos, dando origem a um spin global nulo.

No estado reduzido o espectro de Mössbauer adquirido a temperaturas altas, possui dois doubletos de quadrupolo distintos ($\Delta E_{Q1} \approx 0.59-0.97$ mm/s e $\delta_1 \approx 0.30-0.35$ mm/s, $\Delta E_{Q2} \approx 2.63-3.14$ mm/s e $\delta_2 \approx 0.55-0.65$ mm/s) com intensidades semelhantes. O doubleto de maior desvio isomérico e desdobramento de quadrupolo, é atribuído ao ferro ferroso (spin alto, $S = 2$). A temperaturas baixas, o espectro observado é magnético. Estudando o comportamento do espectro com a aplicação de campos magnéticos externos, é possível resolver o espectro em duas componentes de igual intensidade. Os parâmetros obtidos para diversos agregados deste tipo são apresentados na tabela II.5. Um resultado a sublinhar é o facto de os valores de A serem positivos para a componente com maior desvio isomérico, isto é para a componente devida ao ferro ferroso. Isto implica que o ferro ferroso tem que estar antiferromagneticamente acoplado com o ferro férrico (resultado em concordância com o atrás descrito para a espectroscopia de RPE).

II.3.2. Agregados do tipo "Rieske"

Extremamente parecido com o agregado atrás referido como $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$, este tipo de agregado foi encontrado pela primeira vez por Rieske e colaboradores numa proteína de ferro-enzofre que é parte integrante do complexo bc_1 (ou complexo III) isolado de mitocôndrias bovinas e que é necessária à transdução de energia em sistemas membranares de bactérias, plantas e animais^{40,41,42}. Desde então este tipo de centro foi também encontrado em diversas dioxigenases bacterianas que estão envolvidas na catálise de compostos aromáticos^{43,44,45,46} (ver tabela II.1).

Na ausência de dados cristalográficos, diversas espectroscopias têm sido utilizadas no estudo dos centros "Rieske". Como resultado desses estudos, foi proposto o modelo da figura II.1c, no qual um dos átomos de ferro possui uma coordenação tetraédrica mista,

constituída por dois enxofres labéis (ligandos partilhados pelos dois ferros) e dois resíduos de histidina.

O espectro de UV-visível destas proteínas apresenta uma banda alargada aproximadamente a 550 nm e picos de absorção aproximadamente a 460 e 320-370 nm. Por redução, observa-se a perda de absorvância (especialmente significativa para as bandas a 550 e 460) e o aparecimento de novos máximos a 380 e 520 nm.^{43,47,48}

Tal como nos agregados do tipo $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$ existem dois estados de oxidação possíveis. No entanto, os potenciais de oxidação-redução dos agregados do tipo "Rieske" são mais positivos, variando entre +350 e -150 mV⁴⁹ (ver tabela II.3).

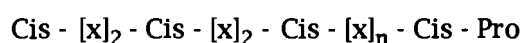
O espectro de RPE, da forma reduzida, apresenta ressonâncias na região de $g = 2$. No entanto, o valor obtido para $g_{\text{médio}}$ (aproximadamente 1.91) é inferior ao obtido para os agregados $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$ (ver tabela II.4). Esta simples observação, conjugada com o facto de a substituição de um enxofre lábil por selénio (ligando com maior aptidão para doar electrões) provocar um aumento no valor de $g_{\text{médio}}$, levou a que Blumberg e Peisach³⁷ propusessem que os agregados do tipo "Rieske" possuíssem um ou mais ligandos que fossem doadores electrónicos mais fracos do que o enxofre. A utilização da espectroscopia de ENDOR veio esclarecer que os dois ligandos do ferro ferroso eram histidinas.^{50,51}

O espectro de Mössbauer da forma oxidada da proteína "Rieske" isolada de *Thermus thermophilus* apresenta dois doubletos de quadrupolo distintos e de igual intensidade. Na forma reduzida o espectro de Mössbauer, obtido a baixa temperatura, contém uma espécie magnética extremamente semelhante ao da Putidaredoxina ($\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$). A principal diferença deste espectro quando comparado com o espectro típico dos agregados $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$, é o facto de neste caso o desvio isomérico do ferro ferroso ser mais elevado. Assim, pode-se admitir a possibilidade da existência de ligandos azotados e/ou oxigenados.⁵²

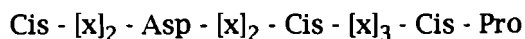
II.4. Agregados de [4Fe-4S].

Os agregados [4Fe-4S] encontram-se vastamente nos seres vivos. São, provavelmente, o agregado de ferro-enxofre mais abundante e disseminado na natureza. Encontrados frequentemente em associações com outros cofactores, este tipo de agregados desempenham um papel fundamental, quer como transportador electrónico, quer como enzimas. A facilidade com que se agregam e, como veremos nas próximas secções, a possibilidade de se interconverterem noutros tipos de centros permite que a sua actividade seja extraordinariamente bem regulada.

A estrutura de vários agregados de [4Fe-4S] foi já determinada através da cristalografia de raio-X (ver figura II.1d e II.1e).^{53,54,55,56} O agregado tem a forma de um cubo cujos vértices são preenchidos alternadamente por átomos de ferro e enxofre lábil. Cada um dos átomos de ferro é coordenado tetraedricamente por três átomos de enxofre e um resíduo de cisteína proveniente da cadeia polipeptídica. Existem no entanto casos em que um desses resíduos é substituído por um grupo oxigenado (p.e. um grupo hidroxilo, ou um grupo carboxilato).^{57,58,59} Normalmente os resíduos de cisteína encontram-se dispostos na sequência de ácidos aminados da proteína num padrão bem definido. Por exemplo, o padrão seguinte é constante na maioria das ferredoxinas com dois agregados de [4Fe-4S] e, pelo menos em parte, constante na maioria das proteínas que contêm agregados deste tipo⁶⁰:

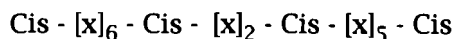


Uma excepção a esta regra vem da ferredoxina de *Pyrococcus furiosus*⁵⁹. Nesta proteína a sequência é a seguinte:



Como é possível observar, uma das cisteínas que é ligando do ferro foi substituída na sequência por um ácido aspártico. Em conjunção com vários dados espectroscópicos, foi proposto que neste caso o ácido aspártico substituiu a cisteína na função de ligando do agregado de [4Fe-4S].

Outros dados demonstram a existência de um agregado com um padrão de cisteínas mais compacto, tal como pode ser constatado pela sequência da endonuclease III⁶¹:



Estes agregados podem possuir três estados de oxidação diferentes em dois tipos de proteínas. Assim, na maioria dos agregados o estado formal de oxidação pode variar entre os estados $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ e $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$, variando o potencial de oxidação-redução entre os -645 e os 0 mV. No entanto nas proteínas de ferro de alto potencial (HiPIP) os estados de oxidação variam entre o estado $[\text{4Fe-4S}]^{3+}$ e o estado $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$. Neste caso, os potenciais são substancialmente mais elevados, variando entre os +50 e os +450 mV. Diversas tentativas de racionalização desta grande diferença de potenciais foram já efectuadas, tendo por base a estrutura dos agregados.^{62,63} Estudos efectuados por Cammack e colaboradores revelaram que o potencial não é devido ao agregado, mas sim devido à estrutura proteica, uma vez que qualquer um dos três estados de oxidação é passível de ser obtido quando a proteína é sujeita à desnaturação.⁶⁴ No entanto, após a reconstituição do centro apenas é possível obter os estados de oxidação permitidos antes de ter ocorrido a desnaturação. É ainda conhecido o caso da endonuclease III, no qual o agregado mostra-se extraordinariamente resistente quer à oxidação ou à redução permanecendo sempre no estado $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$.

Contrariamente aos agregados de ferro-enxofre atrás referidos (FeCis_4 e $[\text{2Fe-2S}]$), os agregados de $[\text{4Fe-4S}]$ dão às proteínas que os contêm uma cor acastanhada, pois contribuem para o espectro de UV-visível com bandas de absorção alargadas entre os 380 e os 400 nm.^{65,66} Por redução observa-se apenas uma perda parcial da absorvância. Uma excepção a esta regra é dada pelas proteínas HiPIP. Neste caso, após a redução as proteínas apresentam um pico da absorvância aproximadamente a 388 nm.⁶⁷ Como é possível verificar pela análise dos valores apresentados na tabela II.2 (ver também os dados apresentados no capítulo VII), o espectro de UV-visível não é característico unicamente deste tipo de agregado. Assim é absolutamente necessário recorrer a outros tipos de espectroscopia de modo a tornar possível uma caracterização eficaz.

No estado de oxidação $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, comum aos dois tipos de proteínas (tipo ferredoxina e HiPIP), o agregado está no estado diamagnético e portanto é silencioso na espectroscopia de RPE. No entanto, por redução ou oxidação monoelectrónica obtém-se uma forma paramagnética, com $S = 1/2$.

Um caso representativo do agregado no estado $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$ é o estado reduzido da ferredoxina I (Fd I) de *D. gigas*.⁶⁸ Neste estado o espectro de RPE apresenta ressonâncias a campo alto ($g = 2.07, 1.94, 1.91$), sendo normalmente designado por sinal do tipo "1.94". Este estado pode ser explicado assumindo um acoplamento entre pares de átomos de ferro do agregado (três ferros ferrosos e um ferro férrico, todos no estado de spin alto). Assim, o esquema para o acoplamento seria o seguinte: o ferro férrico ($S = 5/2$) estará acoplado ferromagneticamente com um dos ferros ferrosos ($S = 2$), com este par a gerar um estado com $S = 9/2$. O segundo par de ferros ferrosos encontra-se também acoplado ferromagneticamente originando portanto um estado com $S = 4$. Finalmente, do acoplamento antiferromagnético entre os dois pares daria origem ao estado com $S = 1/2$.

No entanto, não é obrigatório que o estado fundamental destes agregados seja um estado com $S = 1/2$. Existem diversos casos onde foi possível detectar vários estados fundamentais com $S \geq 1/2$. Uma destas observações foi efectuada para o estado +1 dos agregados de $[4\text{Fe-4Se}]$ ^{69,70} (nos quais os átomos de enxofre lábeis foram substituídos por átomos de selénio). Neste caso o espectro de RPE contém ressonâncias atribuídas a estados com $S = 1/2$ ($g = 2.103, 1.940$ e 1.888), $S = 3/2$ ($g = 4.35$ e 3.5) e $S = 7/2$ ($g = 5.172$). Um modelo de acoplamento que permite explicar a coexistência destes diversos estados de spin foi proposto por Noodleman.⁷¹ Neste modelo a existência e predominância dos diversos estados de spin foi explicada com base no grau de interacção entre as componentes ferromagnéticas e antiferromagnéticas do acoplamento.

No estado oxidado das proteínas HiPIP ($[4\text{Fe-4S}]^{+3}$) observa-se também um conjunto de ressonâncias a campo alto.^{72,73} No entanto, estas ressonâncias possuem todos valores de g superiores a 2. O esquema de acoplamentos é semelhante ao descrito para a Fd I, mas é necessário ter em conta a existência de três ferros no estado férrico e apenas um ferroso.

Assim, o acoplamento antiferromagnético de um par diférico (acoplamento ferromagnético, $S = 5$) com um par férrico-ferroso (acoplamento ferromagnético, $S = 9/2$) produz o estado com $S = 1/2$.

A espectroscopia de Mössbauer permite-nos obter informação sobre o estado diamagnético do agregado (estado $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$). O espectro obtido na ausência de campo magnético aplicado é constituído aparentemente por um único duplete de quadrupolo, facto indicativo da presença de uma valência deslocalizada⁷⁴ (excepção verificada apenas na Fd I de *D. gigas*, onde um dos ferros possui um carácter férrico mais acentuado). Caso assim não fosse, seria de esperar que o espectro apresentasse pelo menos dois dupletos de quadrupolo (um para os ferros ferrosos e outro, com menor desvio isomérico, para os ferros férricos). Apesar de não existir resolução suficiente, é comum encontrar valores para quatro dupletos de quadrupolo distintos com os seguintes parâmetros: $\Delta E_Q \approx 0.70\text{-}1.5$ mm/s e $\delta \approx 0.37\text{-}0.46$ mm/s (ver tabela II.5). A excepção aos valores referidos vêm do espectro de Mössbauer da aconitase na presença de substrato, no qual o átomo de ferro ao qual se liga o substrato sofre uma grande mudança nos valores de desvio isomérico ($\delta \approx 0.69\text{-}0.71$ mm/s) e desdobramento de quadrupolo ($\Delta E_Q \approx 0.95\text{-}1.91$ mm/s)⁵⁷. O facto de estarmos na presença de uma espécie com $S = 0$ é confirmado pela obtenção de um espectro de três linhas na presença de campos magnéticos elevados.⁷⁵

O estado $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$ apresenta um espectro magnético que pode ser simulado por duas componentes representantes dos pares de ferros, atrás referidos, que se encontram acoplados antiferromagneticamente (acoplamento evidenciado pelo facto das componentes possuírem valores de A simétricos)^{74,76}. Os espectros adquiridos às temperaturas elevadas revelam, como seria de esperar, o aumento dos valores de desvio isomérico ($\delta \approx 0.43\text{-}0.62$ mm/s) e do valor absoluto do duplete de quadrupolo ($\Delta E_Q \approx 0.60\text{-}2.60$ mm/s).

Resta o estado mais oxidado do agregado (estado $[4\text{Fe-4S}]^{+3}$) presente nas proteínas HiPIP. Como foi já descrito para a espectroscopia de RPE, este estado é paramagnético ($S = 1/2$).^{72,73} Como tal, no espectro de Mössbauer observa-se um espectro magnético que pode ser resolvido em duas componentes. A de menor desvio isomérico (e com valores de A

positivos) pode ser atribuída ao par diférrico, enquanto que a de maior desvio isomérico (e com valores negativos de A) corresponderá ao par férrico-ferroso. Mais uma vez salienta-se o facto dos valores de A das componentes serem simétricos.

II.5. Agregados de [3Fe-4S].

Extremamente relacionados com os agregados de [4Fe-4S], os agregados de [3Fe-4S] foram já encontrados em algumas ferredoxinas (Fd I de *Azotobacter vinelandii*⁵⁶, Fd II de *D. gigas*⁷⁷, Fd III de *D. africanus*⁷⁸, Fd de *Methanosarcina barkeri*⁷⁹ e Fd *Pyrococcus furiosus*⁵⁹), hidrogenases (*D. gigas*, *D. desulfuricans* ATCC 27774 e *C. vinosum*) e na aconitase⁵⁷. Inicialmente a estrutura deste agregado foi bastante controversa. A primeira interpretação dos dados obtidos pela cristalografia de raios-X implicava que o agregado fosse planar⁸⁰ (i.e. que os três átomos de ferro que constituem o agregado estivessem colocados num mesmo plano), parecendo que este agregado teria tido origem na "inserção" de um átomo de ferro num agregado do tipo [2Fe-2S]. Interpretações subsequentes contrariaram este facto.^{56,81} Com efeito, e como tinha sido previsto pela espectroscopia em geral, a estrutura do agregado de [3Fe-4S] deriva da estrutura do agregado de [4Fe-4S], por perda de um átomo de ferro de um dos vértices do cubo (ver figura II.1f).

As semelhanças entre estes dois tipos de estruturas estendem-se ao nível da estrutura primária. Na maioria dos casos a estrutura é idêntica (como veremos as proteínas possuem a capacidade de interconverter entre os dois tipos de centros), existindo no entanto alguns casos onde o número de cisteínas é inferior ao necessário para a coordenação dos ferros.⁵⁸

O agregado de [3Fe-4S] tem dois estados de oxidação possíveis: i) o estado oxidado ([3Fe-4S]⁺¹), no qual todos os ferros se encontram no estado férrico; ii) o estado reduzido ([3Fe-4S]⁰), obtido por redução monoelectrónica do estado oxidado e como tal possuindo dois ferros férricos e um ferroso. O potencial de oxidação-redução destes agregados está dentro da gama do potencial observado para os agregados de [4Fe-4S] (ver tabela II.3). Recentemente, através de técnicas electroquímicas, foi possível obter dados experimentais que indicam a

possibilidade de existência de um estado de oxidação $[3\text{Fe-4S}]^{-2}$ no qual os três átomos de ferro do agregado se encontram no estado ferroso.⁸²

O espectro de UV-visível é muito semelhante ao descrito para os agregados de $[4\text{Fe-4S}]^{65}$, razão pela qual se torna pouco informativo. O mesmo não se pode dizer das espectroscopias de RPE e de Mössbauer, visto ter sido a conjunção de dados obtidos por estas técnicas que permitiu a identificação dos agregados de $[3\text{Fe-4S}]$.^{57,77,83}

Tal como nos agregados de $[4\text{Fe-4S}]$, o conceito de deslocalização/valência mista é muito importante para a compreensão dos diversos dados espectroscópicos. No estado oxidado o agregado possui spin igual a $1/2$. Isso mesmo é reflectido no seu espectro de RPE que apresenta um conjunto de ressonâncias centradas a $g \approx 2.02$ (sinal aproximadamente axial).⁷⁹ O espectro de Mössbauer adquirido a temperatura elevada, evidencia a ligação tetraédrica de resíduos de cisteína bem como o estado férrico dos três ferros presentes (um único dobleto de quadrupolo com $\delta \approx 0.27$ mm/s). O estado de spin $S = 1/2$ foi explicado através de um modelo de acoplamento antiferromagnético entre os três ferros férricos de spin alto.⁸⁴

No estado reduzido estamos na presença de um sistema de spin com $S = 2$. Na Fd II de *D. gigas*, este facto é confirmado pela presença no espectro de RPE de uma ressonância a campo baixo ($g \approx 12$) proveniente do dobleto de menor energia.⁸⁵ O espectro de Mössbauer, adquirido a 4.2 K, contém dois dobletos de quadrupolo com os seguintes parâmetros: $\Delta E_{Q1} = 1.40\text{-}1.47$ mm/s, $\delta_1 = 0.46\text{-}0.47$ mm/s e $\Delta E_{Q2} = 0.40\text{-}0.47$ mm/s, $\delta_2 = 0.29\text{-}0.30$ mm/s. O segundo destes dobletos possui $\approx 1/3$ da absorção total do espectro, podendo ser atribuído a um ferro no estado férrico de spin alto. Os restantes $2/3$ da absorção são atribuídos aos outros dois ferros do agregado. O valor obtido para δ_2 leva à atribuição de uma valência mista, o que significa que o electrão em excesso se encontra deslocalizado entre estes dois ferros. Podemos assim afirmar que estes ferros possuem uma valência igual a $+2.5$. O estado de spin do agregado ($S = 2$) pode então ser explicado como resultante do acoplamento entre este par de valência mista ($S = 9/2$) com o ferro férrico de spin alto ($S = 5/2$).⁸⁵

II.6. Interconversão entre [3Fe-4S] e [4Fe-4S].

Os agregado de [4Fe-4S] e de [3Fe-4S] estão intimamente relacionados pois, como se afirmou anteriormente, existe a possibilidade única de interconversão. Existem diversos exemplos desta interconversão, na sua maioria evidenciada utilizando as espectroscopias de Mössbauer e de R.P.E.^{86,87,88,89,90}

A transformação de um agregado de [4Fe-4S] num de [3Fe-4S] pode ser possível através da oxidação com ferricianeto de potássio.^{57,91} Concomitantemente, observa-se o aparecimento de um sinal a $g = 2.02$ no espectro de R.P.E., assim como o aparecimento de dois doublets de quadrupolo (intensidades $\approx 2:1$, com parâmetros típicos dos agregados de [3Fe-4S]) no espectro de Mössbauer, a temperaturas altas. O processo contrário ([3Fe-4S] \rightarrow [4Fe-4S]) pode ser efectuado por incubação, em condições redutoras, da proteína contendo o agregado de [3Fe-4S] com Fe^{2+} . A conversão é verificada pelo aparecimento de um espectro de Mössbauer típico dos agregados de [4Fe-4S].

Foi ainda demonstrado a possibilidade de reconstituição da totalidade do agregado, a partir da apoproteína.⁹² A conjugação desta técnica com as de interconversão entre os centros possibilitou a marcação isotópica dos átomos de ferro destes agregados (ver figura II.2). Esta possibilidade de marcação revelou-se muito importante no esclarecimento do mecanismo da aconitase.⁵⁷

II.7. Agregados heterometálicos do tipo [M,3Fe-4S].

A possibilidade de inserção de um átomo de ferro no sítio vago da estrutura cubana do agregado de [3Fe-4S], levou à tentativa de inserção de outros tipos de metais. Mediante a utilização de duas diferentes estruturas proteicas (Fd II *D. gigas*^{93,94}, Fd *P. furiosus*^{95,96}) foi já conseguida uma grande variedade de agregados heterometálicos (ver figura II.2). Uma observação interessante é o facto de ter sido possível verificar que o estado de oxidação formal dos ferros, após ter sido efectuada a redução monoelectrónica destes agregados, é equivalente ao obtido para o agregado de [3Fe-4S]. Isto é, o electrão encontra-se deslocalizado

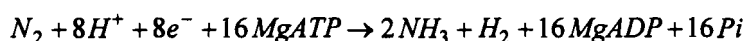
por dois dos átomos de ferro enquanto que o terceiro comporta-se como um ferro férrico do tipo da rubredoxina.

II.8. Agregados com estequiometria superior.

Recentemente têm vindo a ser publicados diversos dados espectroscópicos que revelam a existência de agregados de ferro-enxofre com mais de 4 átomos de ferro. Os exemplos são uma proteína monomérica purificada de *D. vulgaris*⁹⁷ e de *D. desulfuricans* ATCC 27774⁹⁸ (ver também capítulo VII), os agregados H das hidrogenases de ferro⁹⁹ e os agregados P e FeMo da dinitrogenase.¹⁰⁰ Outra variante surge nas redutases do sulfito sob a forma do agregado de [4Fe-4S] acoplado a um sirohemo.

II.8.1. A nitrogenase.

As nitrogenases bacterianas são de importancia fundamental no ciclo global do azoto, pois catalisam a redução do azoto molecular a amónia.¹⁰¹ A estequiometria mínima para esta reacção é a seguinte:



O sistema enzimático que catalisa a referida reacção é constituído por dois componentes: *i*) a proteína de ferro (proteína Fe ou dinitrogenase redutase) é uma proteína homodimérica (γ_2 , MM \approx 60000 Da) que possui um agregado de [4Fe-4S] e *ii*) a proteína dependente de molibdénio (proteína FeMo ou dinitrogenase) que se apresenta na forma de um heterotetrâmero ($\alpha_2\beta_2$, MM \approx 250000 Da) e possui dois pares de agregados P e cofactores FeMo. Alternativamente, na proteína FeMo, o molibdénio presente no cofactor pode ser substituído por vanádio ou ferro.^{102,103,104} Durante a catálise os electrões são cedidos, um de cada vez, pela proteína de Fe à proteína FeMo, complexo que envolve a associação das proteínas e a hidrólise de pelo menos duas moléculas de MgATP.

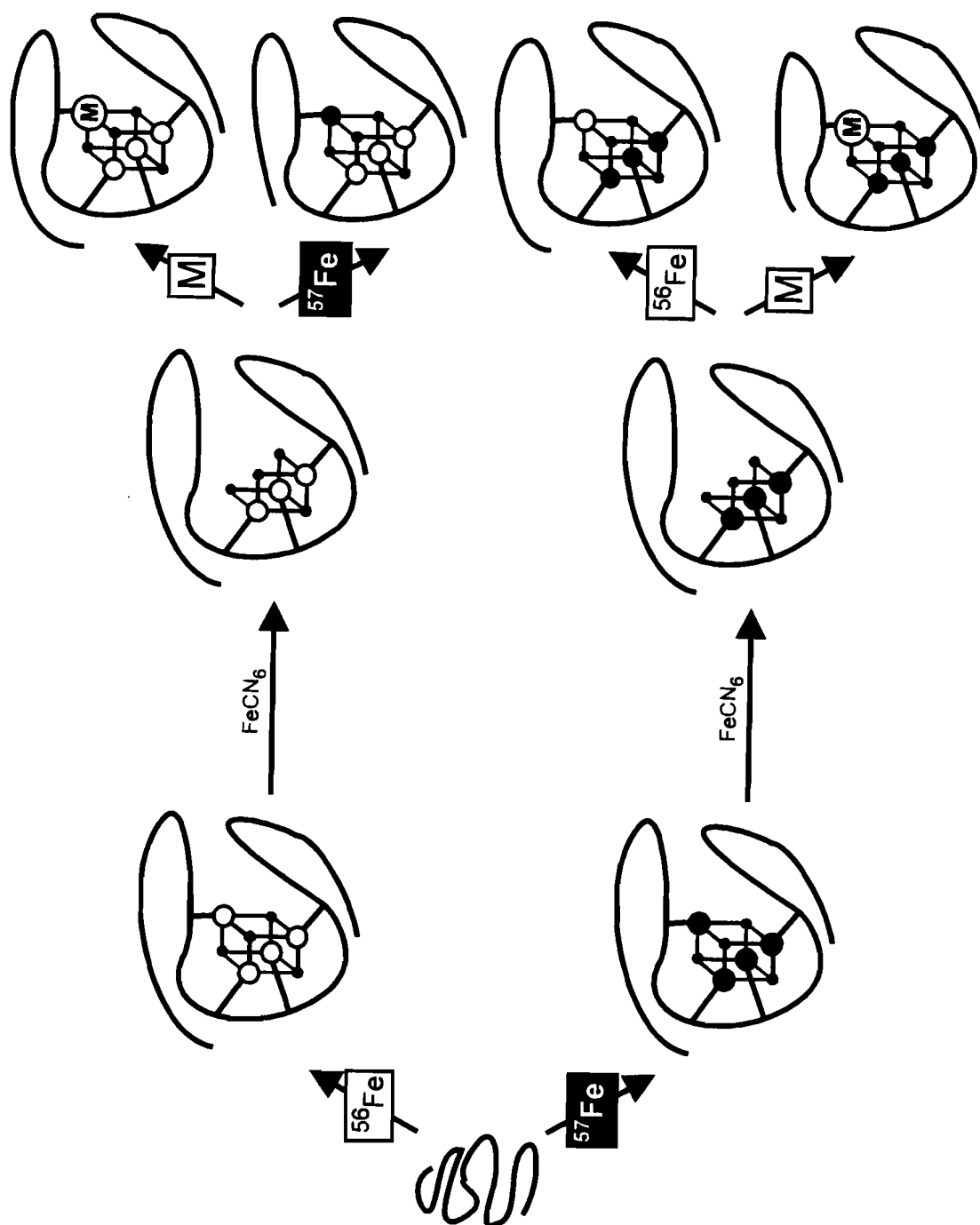


Figura II.2 - Reconstituição, interconversão de agregados [3Fe-4S] e [4Fe-4S]. Formação de agregados heterometálicos. Estratégia de marcação selectiva de ferros nos agregados de [4Fe-4S]. **M** = Co, Ni, Cd, Zn, Ga, Tl, Cu.

A estrutura terciária da proteína FeMo isolada de *Azotobacter vinelandii* foi recentemente determinada através da cristalografia de raios-X.¹⁰⁰ Assim, tornou-se possível obter a estrutura dos agregados P e do cofactor FeMo e estabelecer paralelos entre esta e os dados espectroscópicos até agora obtidos.

Cada um dos agregados P é constituído por 8 átomos de ferro coordenados tetraedricamente por enxofres (ver figura II.1g). Estes agregados estão situados na interface entre as subunidades α e β (pertencentes ao mesmo dímero), aproximadamente a 10 Å da superfície. Podem facilmente ser descritos como duas estruturas cuboides (semelhantes às presentes nos agregados [4Fe-4S]) ligadas entre si através de dois resíduos de cisteína que estabelecem a ponte entre dois diferentes átomos de ferro (um de cada cubano). A participação das subunidades na ligação dos agregados é equivalente, pois são utilizadas três cisteínas de cada subunidade. Uma terceira ligação é efectuada por um par de enxofres lábeis, através de uma ponte dissulfureto.

Este agregado pode ocorrer em, pelo menos, três diferentes estados de oxidação (ver figura II.4e).¹⁰⁵ No estado de oxidação a que se convencionou chamar nativo (P^N), os agregados P encontram-se totalmente reduzidos e são diamagnéticos. Por oxidação com tionina ou ferricianeto de potássio, é possível obter o primeiro estado de oxidação, designado por P^{OX1} . Após variadas tentativas de explicação das características espectroscópicas deste estado, foi possível acomodar os dados provenientes das espectroscopias RPE e Mössbauer numa só teoria. Por RPE foi possível observar uma ressonância a $g \approx 12$, cuja intensidade é ampliada quando o espectro de RPE é adquirido no modo paralelo. Este sinal foi interpretado como sendo proveniente de um estado com spin $S = 3$ ou $S = 4$.^{105,106} No entanto, no espectro de Mössbauer adquirido na ausência de campo magnético aplicado, a componente atribuída ao estado P^{OX1} possui características de compostos com um número ímpar de electrões (i.e. são observadas interacções magnéticas hiperfinas, tal como nos sistemas de Kramer que possuem grande anisotropia para os valores de g). Esta aparente incoerência foi resolvida após Surerus e colaboradores desenvolverem um formalismo do Hamiltoniano de spin para sistemas não-Kramer, que possibilitou explicar o espectro magnético com base num sistema

de spin inteiro. Assim, a transição do estado P^N para o estado P^{OX_1} envolve necessariamente a remoção de dois electrões por agregado P.

Por adição de tionina ao estado P^{OX_1} obtém-se um estado mais oxidado (estado P^{OX_2}). Esta transição envolve apenas a troca de um electrão por agregado P, dando origem a um estado paramagnético.^{105,107} No espectro de RPE são visíveis dois conjuntos de ressonâncias: *i*) um conjunto com valores de $g = 1.97, 1.88$ e 1.68 , atribuídas a um sistema com $S = 1/2$ e *ii*) um conjunto de ressonâncias a campo baixo ($g = 10.4, 5.8$ e 5.5) interpretadas como provenientes de um sistema de spin com $S = 7/2$, $D = -3.7 \text{ cm}^{-1}$ e $|E| = 0.16$. A evolução da intensidade destes sinais ao longo de titulações potenciométricas leva a pensar que ambas as espécies estão associadas ao estado P^{OX_2} .

A tentativa de obtenção de estados mais oxidados do que P^{OX_2} não foi totalmente bem sucedida.¹⁰⁵ A adição de um grande excesso de tionina provoca a aparição de diversas ressonâncias ($g = 15, 13, 6.91$ e 6.41) que podem ser interpretados como fazendo parte de diversos sistemas de spin ($S = 4, S = 7/2$ e $S = 9/2$). No entanto esta oxidação não é reversível, colocando-se a hipótese da destruição do agregado (hipótese substantiada pelo aumento do sinal a $g = 4.3$).

Observando a estrutura do cofactor FeMo, verifica-se que este é constituído por um esqueleto de metais (ferro e molibdénio), enxofre e uma molécula de homocitrato.¹⁰⁰ Na base desse esqueleto estão duas estruturas semi-cuboides que partilham grande analogia com os agregados atrás referidos como $[Mo_3Fe_4S]$ e $[4Fe_4S]$ (ver figura II.1h). Estas duas estruturas encontram-se ligadas entre si por três átomos de enxofre lábil, criando uma nova estequiometria ($[Mo_7Fe_9S]$). Um facto a salientar é que, aparentemente, seis dos átomos de ferro (precisamente aqueles que estão envolvidos nas pontes Fe-S-Fe) possuem uma esfera de coordenação trigonal. O cofactor FeMo localiza-se na subunidade α , estando a ela ligado através de um resíduo de histidina (ligando do molibdénio) e outro de cisteína (ligando do único ferro que possui uma esfera de coordenação tetraédrica). O molibdénio encontra-se ainda ligado a uma molécula de homocitrato através dos grupos 2-hidroxi e 2-carboxil, completando-se assim a esfera de coordenação octaédrica onde está inserido.

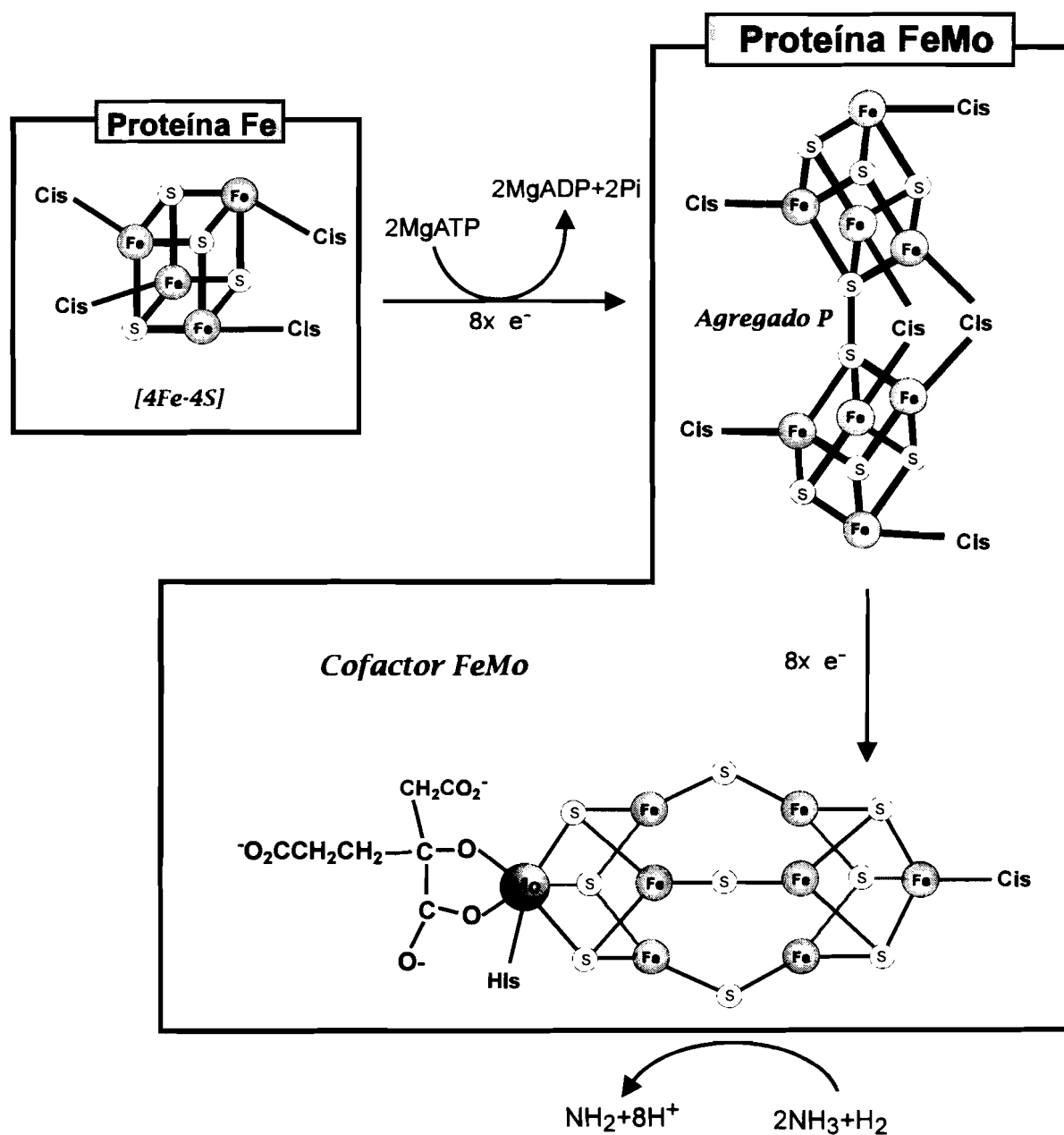


Figura II.3 - Caminho dos electrões na redução do azoto molecular pela nitrogenase (adaptado da referência 101).

No estado de oxidação nativo (M^N) o espectro de RPE apresenta ressonâncias a $g = 4.3, 3.7$ e 2.0 , atribuídas a um sistema com $S = 3/2$. Após oxidação monoelectrónica (p.e. por adição de tionina) o cofactor FeMo passa a ser diamagnético.¹⁰⁵

A estrutura da proteína de ferro foi também resolvida pela cristalografia de raios-X¹⁰⁸. A estrutura dimérica abriga na sua interface um agregado do tipo $[4Fe-4S]$ e o local de ligação do MgATP. Os ligandos do agregado são partilhados equitativamente pelas duas subunidades, ou seja cada subunidade estabelece duas ligações com o agregado através de um número equivalente de cisteínas. Assim, o agregado $[4Fe-4S]$ permanece ligado simetricamente entre as subunidades. A comparação da estrutura primária, bem como do enrolamento da cadeia polipeptídica de cada monómero, com outras proteínas que ligam nucleotídeos, revelou a possível existência de um sítio específico de ligação por subunidade. Uma das consequências da ligação de MgATP (ou MgADP) é a existência de um decréscimo de aproximadamente 100 mV no potencial de oxidação-redução. No entanto, este sítio encontra-se aproximadamente a 20 Å do agregado $[4Fe-4S]$, impossibilitando a existência de interacções directas. A conclusão que se pode extrair é que a ligação dos nucleotídeos leva a alterações conformacionais da proteína que causa mudanças significativas no ambiente do agregado e que facilitam o processo de transferência electrónica para os agregados P.

Como atrás foi dito, existem dois estados de oxidação possíveis para este tipo de agregados: *i*) estado oxidado ($[4Fe-4S]^{+2}$), no qual o agregado é diamagnético e *ii*) o estado reduzido ($[4Fe-4S]^{+1}$). Neste último estado, o espectro de RPE possui ressonâncias a $g = 2.05, 1.94$ e 1.88 , típicas de um sistema de spin com $S = 1/2$ (e de um agregado do tipo $[4Fe-4S]$). No entanto diversas quantificações desses sinais resultaram em cerca de 0.3 spins/agregado, valor bastante inferior ao esperado (1 spins/agregado).^{109,110,111} Ressonâncias adicionais podem ser observadas a $g = 5.8$ e 5.1 . A intensidade destas ressonâncias é extraordinariamente dependente do solvente. O único sistema de spin que explica esta observação é um com $S = 3/2$, $D \approx -2 \text{ cm}^{-1}$ e $E/D = 0.22$.¹⁰⁹ A conjugação de dados provenientes de susceptibilidade magnética, espectroscopias de Mössbauer e RPE, provaram que a quantidade dos agregados com $S = 3/2$ e $S = 1/2$ é complementar, facto que explica o baixo valor de spins encontrado para as quantificações atrás referidas.

II.8.2. As hidrogenases de ferro.

As hidrogenases são as enzimas biologicamente responsáveis pela oxidação do hidrogénio molecular e/ou redução de protões em processos relacionados com a transferência electrónica e obtenção de energia. Dependendo do organismo e da localização celular de que são isoladas, estas enzimas podem conter diferentes composições de agregados de [4Fe-4S], [3Fe-4S], centros de níquel, níquel/selénio e agregados H. Assim, as hidrogenases podem dividir-se em três classes: i) hidrogenases de níquel¹¹² (2x[4Fe-4S], [4Fe-3S] e um centro de níquel); ii) hidrogenases de níquel/selénio¹¹³ (2x[4Fe-4S] e um centro de níquel possuindo uma seleno-cisteína como ligando) e iii) hidrogenases de ferro¹¹⁴ (2x[4Fe-4S] e um agregado H).

A hidrogenase de ferro isolada da fracção periplásmica de células de *D. vulgaris* (Hildenborough) contém duas subunidades (45.8 e 10 kDa). Análises de metais mostraram que o único metal existente é o ferro, cujo conteúdo varia entre 10 e 16 átomos por molécula de proteína. A sequência de ácidos aminados N-terminal da subunidade maior revelou a existência de uma região homóloga à responsável pela coordenação dos agregados nas ferredoxinas bacterianas com dois agregados do tipo [4Fe-4S] (ferredoxinas de 8 ferros). Os átomos restantes estão organizados numa estrutura designada por agregado H, por se pensar que este agregado esteja directamente envolvido na catálise.

O espectro de RPE desta enzima é complexo, tendo já sido identificados vários tipos de sinais diferentes.^{99,115} Na proteína nativa, foi observada uma ressonância a $g = 2.02$ típica de agregados de [3Fe-4S]. Esta espécie está presente em pequenas quantidades (0.02-0.2 spin/molécula) razão pela qual se pensa ser um artefacto gerado durante a purificação aeróbica da proteína. Um sinal complexo foi observado após redução com ditionito de sódio. Este sinal é muito semelhante aos sinais obtidos, em condições idênticas, nas ferredoxinas de 8 ferros e foi utilizado como prova da existência de dois agregados do tipo [4Fe-4S]. A titulação potenciométrica da enzima revelou a existência de outros dois sinais associados ao agregado H. O sinal denominado rômbo 2.06 ($g = 2.06, 1.96$ e 1.89) tem a intensidade máxima (0.7 spin/molécula) a cerca de -110 mV. Pensa-se que este sinal seja representativo

do agregado H na forma inactiva da enzima. Concomitantemente ao desaparecimento do sinal rômbico 2.06 existe o aparecimento de um novo sinal designado por rômbico 2.10 ($g = 2.10, 2.04$ e 2.00). Este sinal é detectado a potenciais inferiores a -160 mV e   o único que pode ser detectado após reoxidação anaeróbica. Pensa-se portanto que este sinal represente o agregado H na forma activa da enzima. Esta ideia é reforçada pelo facto de o sinal rômbico 2.10, contrariamente ao sinal rômbico 2.06, ser observado na hidrogenase de ferro de *C. pasteurianum* (enzima purificada anaerobicamente devido   sua alta sensibilidade ao oxig nio).

A estrutura dos agregados H é desconhecida. Diversas propostas têm sido apresentadas. A análise do espectro de M ssbauer conduz à hipótese de uma estrutura do tipo $[4\text{Fe-4S}]$. Um estudo baseado na ressonância de Raman sugeriu a presença de agregados do tipo $[2\text{Fe-2S}]$. Finalmente, com base em determinações de ferro e sulfureto (e assumindo a existência de dois agregados do tipo $[4\text{Fe-4S}]$) foi proposta uma estrutura do tipo $[6\text{Fe-6S}]$.

II.8.3. As redutases do sulfito.

As redutases do sulfito catalisam a redução hexaelectr nica do sulfito a sulfureto (e também do nitrito a am nia), tendo sido isoladas de várias bactérias redutoras de sulfato e de *E. coli*. A nível funcional, podem ser feitas duas distinções entre as redutases do sulfito. Algumas destas proteínas (desulfovirdina, desulfurubidina, P-582 e desulfofuscidina) estão envolvidas no metabolismo da respiração anaeróbica do sulfato (i.e. utilização do sulfito como aceitador final de electrões), razão pela qual são denominadas de redutases do sulfito dissimilativas. Contrariamente, outras proteínas (redutase do sulfito de *E. coli*)¹¹⁶ são constituintes das vias metabólicas que levam à produção de compostos contendo enxofre, sendo classificadas como redutases do sulfito assimilativas. Apesar de serem substancialmente diferentes, por exemplo a nível da composição de subunidades e de sequência primária, é interessante o facto de todas elas possuirem um tipo de cofactor único no mundo das metaloproteínas. O centro catalítico   constituído por uma unidade sirohemo acoplado, em todos os estados de oxidação, a um agregado de $[4\text{Fe-4S}]$. Verificou-se também,

que o sirohemo se encontra espacialmente próximo do agregado de $[4\text{Fe-4S}]^{117}$ (um dos átomos de enxofre do agregado está em contacto de Van der Waals com o anel do sirohemo).

No caso das desulfoviridinas alguns dos sirohemos (cerca de 80%) encontram-se desprovidos de metal¹¹⁸. Na proteína nativa, isolada de *D. gigas*, existem três diferentes componentes no espectro de Mössbauer: i) aproximadamente 80% da absorção total do espectro pertence a uma componente diamagnética atribuída aos agregados $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$; ii) cerca de 10% da absorção corresponde a uma componente magnética atribuída à unidade formada pelos agregados de $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$ que se encontram acoplados ao sirohemo férrico de spin alto (componente semelhante à observada para a redutase do sulfito de *E. coli*) e iii) os restantes 10% fazem parte de um espectro magnético atribuído a um ferro férrico mononuclear. Estas percentagens, baseadas num total de 18 átomos de ferro, revelam que apenas cerca de 20% dos sirohemos estão acoplados. Provas adicionais foram obtidas através das espectroscopias de RPE e ressonância de Raman.

II.9. O agregado de $[x\text{Fe-4S}]$ como elemento regulador da função enzimática.

A aconitase é provavelmente o exemplo melhor estudado de uma enzima que contém um agregado de ferro-enxofre como centro activo e que sofre regulação através da modificação estrutural desse agregado.¹¹⁹ A aconitase é uma das enzimas intervenientes no ciclo de Krebs, catalisando a conversão do citrato a isocitrato. Na forma activa a proteína possui um agregado de $[4\text{Fe-4S}]$, no qual apenas três dos átomos de ferro se encontram coordenados a cisteínas. O quarto átomo é o sítio de ligação do substrato. A conversão do agregado de $[4\text{Fe-4S}]$ num agregado de $[3\text{Fe-4S}]$ (tal como atrás foi descrito) origina a perda do quarto átomo de ferro e a perda de actividade. Assim a interconversão do agregado de ferro-enxofre, relacionada com a concentração de ferro disponível na célula, funciona como elemento regulador desta enzima.

Mas para além da função regulatória descrita, a presença/ausência do agregado consegue ainda mobilizar a mesma cadeia polipeptídica para uma função fisiológica diferente. Estudos recentemente descritos demonstraram que a aconitase partilha uma

grande homologia com a proteína de ligação ao elemento regulador do ferro (IRE-BP) também denominado de factor regulatório do ferro ou proteína repressora da ferritina. Como o nome indica esta proteína está envolvida no processo de regulação do ferro. A regulação é exercida através da ligação da IRE-BP a uma estrutura (elemento regulador do ferro, IRE) presente no mRNA da ferritina e do receptor da transferrina. Na presença de ferro a afinidade de ligação da IRE-BP é pequena, tornando assim possível a transcrição dos mRNAs referidos. Estudos detalhados revelaram a possibilidade da IRE-BP ser uma forma alternativa da aconitase citosólica (c-aconitase). Após se ter retirado o agregado de ferro-enxofre à aconitase, foi possível verificar que esta possuía a capacidade de ligação ao IRE.

Em resumo, podemos afirmar que uma só cadeia polipeptídica pode assumir três diferentes tarefas na célula: *i)* actividade de aconitase quando possui um agregado de [4Fe-4S]; *ii)* forma inactiva quando possui um agregado de [3Fe-4S] e *iii)* actividade de IRE-BP na ausência de agregado de ferro-enxofre.

Tabela II.1

Alguns exemplos de proteínas que contêm agregados de ferro-enzofre.

Proteína	Organismo	M.M. (Da)	Número de centros de Fe-S	Outros cofactors	Função	Ref.
FeCis₄						
Rubredoxina	Bactérias anaeróbicas, <i>D. sp.</i>	≈ 6000	1	—	Transferência electrónica	1,2,3, 4,5,6
Rubredoxina	<i>P. oleovorans</i>	19000	2	—	Transferência electrónica no sistema da ω-hidroxilação	9
Desulforedoxina	<i>D. gigas</i>	2 x 4000	2	—	Transferência electrónica ?	22
Fe₂S₂Cis₂						
Ferredoxinas	Plantas, algas, bactérias, tecidos animais	≈ 12000	1	—	Transporte electrónico	28, 29, 36, 120
Oxido-redutase do aldeído	<i>D. gigas</i>	96000	2	Pterina de Mo	$R-CHO + D_{ox} \rightarrow$ $\rightarrow R-COO^- + D_{red}$	121, 122
Redutase da Mono-oxigenase do Metano	<i>M. capsulatus</i> (bath), <i>M. trichosporium</i> OB3b, <i>Methylobacterium</i> sp. CRL-26	40000	1	FAD	Regenera o estado de oxidação da hidroxilase após o ciclo catalítico.	31, 123
Ferroquelatase	Fígado de rato	42000	1	—	Passo final da biossíntese do hemo (Inserção do ferro em porfirinas)	124, 125
Redutase da Putidamonoxina	<i>Pseudomonas putida</i>	42000	1	FMN	Regenera o estado de oxidação da putidamonoxina após o ciclo catalítico.	126
Desidrogenase do dihidroorotato	<i>Clostridium</i> <i>oroticum</i>	115000	2	FAD, FMN	$dihidroorotato + NAD^+ \rightarrow$ $\rightarrow orotato + NADH$	127
Redutase NADH:nitrito	<i>E. coli</i>	92000	1	Sirohemo, FAD	$NO_2^- + 3NADH + 5H^+ \rightarrow$ $\rightarrow NH_4 + 3NAD^+ + 2H_2O$	128
Arsenito oxidase	<i>A. faecalis</i>	85000	2	Pterina de Mo	$Arsenito + O_2 \rightarrow$ $\rightarrow Arsenato + H_2O_2$	129

Tabela II.1 (continuação)

Alguns exemplos de proteínas que contêm agregados de ferro-enzímero.

Proteína	Organismo	M.M. (Da)	Número de centros de Fe-S	Outros cofactores	Função	Ref.
"Rieske"						
Proteínas "Rieske"	<i>T. thermophilus</i> , <i>R. rubrum</i> , Mitocôndrias	≈ 20000	2	—	Transporte electrónico	47
Putidamonoxina	<i>P. putida</i>	3x41000	1	Fe	Componente da demetilase do 4-metoxibenzoato	48
Dioxigenase do benzeno	<i>P. putida</i>	23500 + 54500	1	Fe	$\text{Benzeno} + \text{NADH} + \text{O}_2 \rightarrow$ $\rightarrow \text{Cis} - \text{Benzenoglicol} + \text{NAD}^+$	45, 49
Dioxigenase do tolueno	<i>P. putida</i>	52900 + 21000	1	Fe	Dihidroxição do tolueno	46
Dioxigenase do naftaleno	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIB 9816	2x55000 + 2x20000	1	Fe	<i>Naftaleno</i> ↓ <i>cis(1R,2S) - dihidroxi - 1,2 - dihidronaftaleno</i>	43
[4Fe-4S]						
Ferredoxinas	Bactérias	6000	1	—	Transferência electrónica	130
Redutase do APS	Bactérias redutoras de sulfato	2x70000 + 2x22000	2	FAD	$\text{AMP} - \text{SO}_4 + 2e^- \rightarrow \text{HSO}_3^- + \text{AMP}$	131
Hidrogenase de ferro	<i>D. vulgaris</i>	45800 + 10000	2	agregado H	$2\text{H}^+ + 2e^- \leftrightarrow \text{H}_2$	114
Redutase do sulfito (dissimilativa)	Bactérias redutoras de sulfato	2x50000 + 2x40000 + 2x11000	4	Sirohemo + Fe?	Redução directa do sulfito a sulfureto	118
Redutase do sulfito (assimilativa)	Bactérias redutoras de sulfato	25000	1	Sirohemo	Redução directa do sulfito a sulfureto	118
Proteína de Fe da Nitrogenase	Bactérias fixadoras de azoto.	2x60000	1	MgATP	Transferência electrónica (Redução da proteína de FeMo, acoplada à hidrólise de MgATP)	101
Endonuclease III	<i>E. coli</i>	24000	1	—	Endonuclease apurínica e apirimidínica	61

Tabela II.1 (continuação)

Alguns exemplos de proteínas que contêm agregados de ferro-enzofre.

Proteína	Organismo	M.M. (Da)	Número de centros de Fe-S	Outros cofactores	Função	Ref.
HiPIP	<i>C. vinosum</i>	10000	1	—	—	55, 67
[3Fe-4S]						
Ferredoxina	<i>D. gigas</i> , <i>M. barkeri</i>	6000	1	—	Transferência electrónica	65, 79
Ferredoxina	<i>A. vinelandii</i>	12700	1	[4Fe-4S]	Transferência electrónica	56, 83
Aconitase	Mitocôndrias, bactérias	81000	1	—	<i>Citrato ↔ Isocitrato</i> Nota: A forma activa da enzima contém o agregado na forma [4Fe-4S]	57

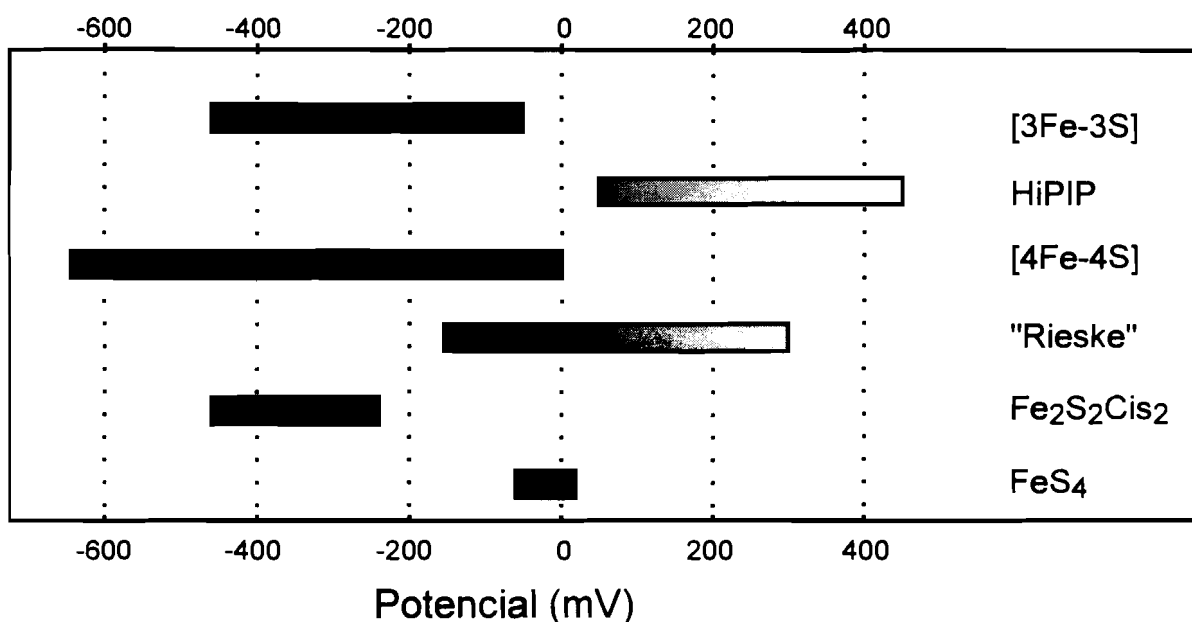
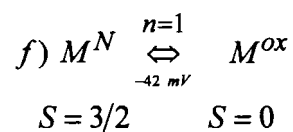
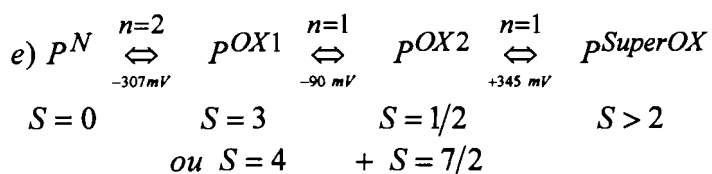
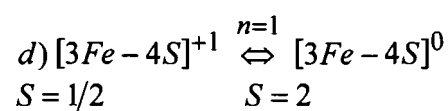
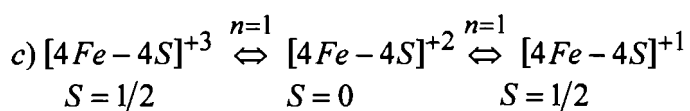
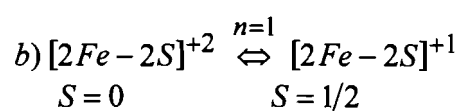
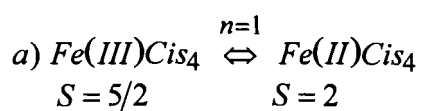


Figura II.4 - Estados de oxidação possíveis e gama de potenciais de oxidação-redução dos diversos agregados de ferro-enxofre.

Tabela II.2

Máximos de absorção no espectro de visível para agregados de ferro-enxofre.

Proteína	Organismo	Máximos (nm)	Referência
<i>FeCis₄</i>			
Rubredoxina	<i>C. pasteurianum</i>	490, 380, 280	7
Rubredoxina	<i>P. oleovorans</i>	495, 377, 280	10
Rubredoxina	<i>D. gigas</i>	493, 376, 278	26
Desulforedoxina	<i>D. gigas</i>	507, 370, 278	22
<i>Fe₂S₂Cis₂</i>			
Ferredoxina IV	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	460, 420, 340, 280	29
Ferredoxina	<i>E. coli</i>	460, 419, 325, 287*, 277	28
Adrenoxina	Cortex adrenal porco	550*, 510*, 455, 414, 320, 276	132
Ferredoxina	Salsa	460, 422, 328, 275	27
Oxido-reductase do aldeído	<i>D. gigas</i>	462, 415, 323, 280	133
Putidaredoxina	<i>Pseudomonas putida</i>	560*, 455, 415	65
"Rieske"			
Proteína "Rieske"	<i>Thermus thermophilus</i>	560*, 458, 330	47
Putidamonoxina	<i>P. putida</i>	570*, 455	48
Dioxigenase do tolueno	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIB 9816	566*, 462, 344	43
Dioxixenase do benzeno	<i>P. putida</i>	560*, 460, 340	52
[4Fe-4S]			
Ferredoxina I	<i>D. gigas</i>	405, 300	65
Endonuclease III	<i>E. coli</i>	410, 280	61
[3Fe-4S]			
Ferredoxina II	<i>D. gigas</i>	453*, 415, 305	65

* Ombro

Tabela II.3

Potenciais de oxidação-redução representativos dos agregados de ferro-enxofre.

Proteína	Organismo	Potencial de oxidação-redução (mV)	Condições	Referência
<i>FeCis₄</i>				
Rubredoxina	<i>Drm. acetoxidans</i>	-46	pH = 8.4	18
Rubredoxina	<i>D. salexigens</i>	-31	pH = 8.4	18
Rubredoxina	<i>D. gigas</i>	+6	pH = 8.4	18
Rubredoxina	<i>C. pasteurianum</i>	-57	pH = 7.0	7
Rubredoxina	<i>P. oleovorans</i>	-37	pH = 7.0	10
Desulforedoxina	<i>D. gigas</i>	-35	pH = 8.0	26
<i>Fe₂S₂Cis₂</i>				
Ferredoxina	<i>E. coli</i>	-380	pH 7.4, 20 °C	28
Adrenoxina	Cortex adrenal de porco	-270	pH 7.0	132
Ferredoxina	Salsa	-416	pH 7.94, 25 °C	47
Ferredoxina	<i>Spirulina platensis</i>	-381	pH 8.0, 25 °C	35
Ferredoxina	<i>Scenedesmus obliquus</i>	-385	pH 8.0, 25 °C	35
Ferredoxina I	<i>Nostoc</i> MAC	-350	pH 8.0, 25 °C	35
Ferredoxina II	<i>Nostoc</i> MAC	-455	pH 8.0, 25 °C	35
Ferredoxina	<i>Porphyra umbilicalis</i>	-380	pH 8.0, 25 °C	35
Oxido-redutase do aldeído	<i>D. gigas</i>	-280 -285	pH 7.6, 25 °C	133
"Rieske"				
Proteína "Rieske"	<i>T. termophilus</i>	140	6.5 < pH < 8.0	134
Dioxigenase do benzeno	<i>P. putida</i>	-112	pH = 7.0	49

Tabela II.3 (continuação)

Potenciais de oxidação-redução representativos dos agregados de ferro-enxofre.

Proteína	Organismo	Potencial de oxidação-redução (mV)	Condições	Referência
[4Fe-4S]				
Ferredoxina I	<i>D. gigas</i>	-450	pH = 7.6	18
Ferredoxina III	<i>D. africanus</i>	-410	PH = 7.4, 2 °C	78
Ferredoxina I	<i>A. chroococcum</i>	-645	pH = 8.3	135
Ferredoxina	<i>P. furiosus</i>	-345	PH = 8.0, 20 °C	136
Reductase do APS	<i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774	-20 < -400	pH = 7.6, 25 °C	137
Proteína de Fe da Nitrogenase	<i>A. vinelandii</i>	-300	—	138
Hidrogenase	<i>D. vulgaris</i>	-330 -340	25 °C	99
Hidrogenase	<i>D. gigas</i>	-290 -340	pH = 7.0, 25 °C	139
HiPIP				
HiPIP	<i>C. vinosum</i>	+356	pH = 7.0, 25 °C	140
HiPIP II	<i>E. halofila</i>	+50	—	141
HiPIP	<i>R. globiformis</i>	+450	—	141
HiPIP	<i>R. gelatinosa</i>	+330	—	141
[3Fe-4S]				
Ferredoxina	<i>P. furiosus</i>	-160	pH = 8.0, 23 °C	136
Ferredoxina III	<i>D. africanus</i>	-140	pH = 7.4, 2 °C	78
Ferredoxina II	<i>D. gigas</i>	-130	pH = 7.6	18
Ferredoxina I	<i>A. vinelandii</i>	-460	pH > 8	135

Tabela II.4

Valores de g de alguns agregados de ferro-enxofre.

Proteína	Organismo	valores de g	g _{médio}	Referências
<i>FeCis₄</i>	(oxidado, +3)			
Rubredoxina	<i>P. oleovorans</i>	9.4, 4.3	—	10
Rubredoxina	<i>D. gigas</i>	9.4, 4.61, 4.27, 4.02	—	26
Desulforedoxina	<i>D. gigas</i>	7.7, 5.7, 4.1	—	26
<i>Fe₂S₂Cis₂</i>	(reduzido, +1)			
Ferredoxina IV	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	2.037, 1.944, 1.894	1.958	29
Ferredoxina	<i>E. coli</i>	2.02, 1.94, 1.94	1.966	28
Adrenoxina	Cortex adrenal do porco	2.02, 1.935, 1.93	1.961	38
Ferredoxina	Salsa	2.05, 1.96, 1.90	1.970	38
Ferredoxina	Espinafre	2.041, 1.949, 1.884	1.958	13
Putidaredoxina	<i>Pseudomonas putida</i>	2.01, 1.94, 1.94	1.963	142
Ferredoxina	<i>Scenedesmus</i>	2.037, 1.944, 1.888	1.956	13
Ferredoxina	<i>Clostridium pasteurianum</i>	2.01, 1.945, 1.92	1.958	37
Ferredoxina	<i>Euglena</i>	2.06, 1.96, 1.89	1.970	38
Ferredoxina	<i>Synechococcus lividus</i>	2.05, 1.96, 1.89	1.966	38
Oxido-redutase do aldeído	<i>D. gigas</i>	2.021, 1.938, 1.919 2.057, 1.970, 1.900	1.959 1.976	143
Redutase (Mono-oxigenase do metano)	<i>M. trichosporium</i> OB3b	2.05, 1.96, 1.86	1.957	144

Tabela II.4 (continuação)

Valores de *g* de alguns agregados de ferro-enzofre.

Proteína	Organismo	valores de <i>g</i>	<i>g</i> médio	Referências
"Rieske" <i>(reduzido, +1)</i>				
Proteína "Rieske"	<i>T. thermophilus</i>	2.02, 1.90, 1.80	1.907	52
Putidamonoxina	<i>P. putida</i>	2.01, 1.91, 1.78	1.900	48
Dioxigenase do benzeno	<i>P. putida</i>	2.018, 1.917, 1.754	1.896	49
[4Fe-4S] <i>(reduzido, +1)</i>				
Ferredoxina I	<i>D. gigas</i>	2.07, 1.94, 1.91	1.973	84
Redutase do APS (Centro I)	<i>D. gigas</i>	2.079, 1.939, 1.897	1.972	75
Ferredoxina III	<i>D. africanus</i>	2.051, 1.931, 1.89	1.957	90
Ferredoxina	<i>P. furiosus</i>	2.10, 1.87, 1.80 5.6, 5.0, 2.6	1.923	59
Aconitase	Coração de boi	2.06, 1.93, 1.86	1.950	57
Hidrogenase	<i>M. barkeri</i>	2.04, 1.89, 1.86 2.08, 1.95, 1.88	1.930 1.970	145
Hidrogenase	<i>D. baculatus</i>	2.03, 1.89, 1.86 2.06, 1.95, 1.88	1.927 1.963	113
HiPIP <i>(oxidado, +3)</i>				
HiPIP	<i>C. vinosum</i>	2.12, 2.04, 2.02	2.06	72
HiPIP	<i>E. halophila</i>	2.146, 2.030	2.07	73
[3Fe-4S] <i>(oxidado, +1)</i>				
Ferredoxina	<i>P. furiosus</i>	2.02, 1.95	—	59
Ferredoxina III	<i>D. africanus</i>	2.01	—	78
Ferredoxina III (Reduzido, 0)	<i>D. africanus</i>	12	—	78
Ferredoxina II	<i>D. gigas</i>	2.02, 2.00, 1.97	—	77
Ferredoxina II (Reduzido, 0)	<i>D. gigas</i>	12	—	85
Ferredoxina I	<i>A. vinelandii</i>	2.01	—	83

Tabela II.5

Parâmetros usados para simular os espectros de Mössbauer de proteínas de ferro-enzofre.

Proteína (Organismo)	Estado de oxidação (Temp., K)	D (cm-1)	E/D	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	A (kG)			η (β)	Ref.
						A_X (g_X)	A_Y (g_Y)	A_Z (g_Z)		
<i>FeCis₄</i>										
Rubredoxina <i>D. gigas</i>	Fe ³⁺	1.5	0.25	-0.47	0.25	-108 (—)	-156 (—)	-158 (—)	0.19	18
Rubredoxina <i>C. pasteurianum</i>	Fe ³⁺ Fe ²⁺	1.9 —	0.23 —	-0.50 3.27	0.32 0.71	-165 (2.0) —	-159 (2.0) —	-169 (2.0) —	0.2 —	146 147
Desulforedoxina <i>D. gigas</i>	Fe ³⁺ Fe ²⁺	2.2 -6	0.08 0.19	-0.75 3.55	0.25 0.70	-154 (2.0) -154 (2.08)	-154 (2.0) -154 (2.02)	-154 (2.0) -154 (2.2)	0.6 (90) 0.35 (10)	25 25
<i>Fe₂S₂Cis₂</i>										
Putidaredoxina <i>P. putida</i>	+1 (4.2 K)	—	—	0.6 -2.7	0.35 0.65	-409 102 (1.94)	-365 153 (1.94)	-314 255 (2.01)	0.5 -3	52, 142
Redutase (Mono-oxigenase do metano)	+1 (4.2 K)	—	—	0.59 -3.00	0.31 0.65	-387 101 (1.96)	-356 108 (1.86)	-314 266 (2.05)	0.0 0.96	144
<i>M. trichosporium</i> OB3b	+2 (4.2 K)	—	—	0.50 0.80	0.27 0.29	—	—	—	—	144
Oxido-redutase do aldeído	+1 (4.2 K)	—	—	1.0 -3.6	0.30 0.60	-380 80	-320 80	-300 220	0.0 -1.5	133
<i>D. gigas</i>	+1 (180 K)	—	—	3.14 2.69 0.97 0.42	0.55 0.57 0.28 0.24	—	—	—	—	133
	+2 (4.2 K)	—	—	0.62	0.27	—	—	—	—	133
	+2 (180 K)	—	—	0.70	0.25	—	—	—	—	133

Tabela II.5 (continuação)

Parâmetros usados para simular os espectros de Mössbauer de proteínas de ferro-enzofre.

Proteína (Organismo)	Estado de oxidação (Temp., K)	D (cm-1)	E/D	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	A (kG)			η (β)	Ref.	
						A_X (g_X)	A_Y (g_Y)	A_Z (g_Z)			
"Rieske"											
Proteína "Rieske"	+1 (4.2 K)	—	—	0.63	0.31	-401	-365	-314	0.0	52	
				3.05	0.74	80	102	241	0.0		
<i>T. thermophilus</i>	+1 (230 K)	—	—	0.61	0.22	—	—	—	—	134	
				2.81	0.65						
	+2 (4.2 K)	—	—	0.91	0.32	—	—	—	—	134	
				0.52	0.24						
Putidamonoxina	+1 (150 K)	—	—	0.70	0.25	—	—	—	—	148	
<i>P. putida</i>				3.04	0.70						
[4Fe-4S]											
Ferredoxina	+1 (4.2 K)	—	—	1.32	0.50	-232	-238	-204	0.78	74	
				1.89	0.58	19	98	63	0.32		
<i>B. stearothermophilus</i>	+2 (4.2 K)	—	—	1.50	0.42	—	—	—	0.7	74	
				1.20	0.43						
				1.10	0.42						
				0.66	0.42						
Hidrogenase	+1 (4.2 K)	—	—	1.0	0.50	30	30	30	0.30	149	
				Agregado I →	1.3	0.55	-180	-220	-250		-0.20
	<i>D. gigas</i>			Agregado II →	1.5	0.50	82	83	83	1.2	149
					-1.2	0.43	-280	-210	-50	1.3	
					1.32	0.44	—	—	—	0.8	
					1.33	0.43				0.8	
	+2 (4.2 K)	—	—	1.00	0.44				0.65		
				0.74	0.41				0.65		
Redutase do sulfito	+1 (4.2 K)	—	—	0.72	0.50	-234	-248	-248	0.0	118	
				1.93	0.62	139	161	80	0.0		
<i>D. gigas</i>	+2 (4.2 K)	—	—	1.45	0.45	—	—	—	—	118	
				1.10	0.45						
				1.10	0.45						
				0.72	0.41						

Tabela II.5 (continuação)

Parâmetros usados para simular os espectros de Mössbauer de proteínas de ferro-enxofre.

Proteína (Organismo)	Estado de oxidação (Temp., K)	D (cm-1)	E/D	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	A (kG)			η (β)	Ref.
						A_X (g_X)	A_Y (g_Y)	A_Z (g_Z)		
Hidrogenase <i>D. baculatus</i>	+1 (4.2 K)	—	—	1.0	0.50	30	30	30	0.30	113
				1.3	0.55	-180	-220	-250	0.20	
				1.7	0.50	83	83	83	1.2	
				-1.2	0.42	-240	-210	-60	1.3	
	+2 (4.2 K)	—	—	1.40	0.46	—	—	—	0.8	113
				1.25	0.42				0.8	
				1.05	0.42				0.65	
				0.72	0.37				0.65	
Redutase do APS <i>D. gigas</i>	+1 (4.2 K)	—	—	2.20	0.63	180	125	35	0.7	75
				1.30	0.54	-240	-235	-190	0.7	
				1.50	0.60	180	60	55	0.5	
				1.10	0.55	-215	-255	-200	0.5	
	+2 (4.2 K)	—	—	1.44	0.45	—	—	—	0.7	75
				1.30	0.45				0.9	
				1.12	0.45				0.9	
				0.71	0.41				0.9	
Ferredoxina <i>C. pasteurianum</i>	+1 (4.2 K)	—	—	1.70	0.55	90	40	27	0.5	74
				1.05	0.50	-112	-112	-85	0.5	
Aconitase	+1 (4.2 K)	—	—	1.15	0.49	-285	-285	-234	0.0	150
				-2.6	0.64	88	88	161	0.0	
				+2.6	1.00	248	248	190	0.0	
Coração de boi	+2 (4.2 K)	—	—	1.34 (75%)	0.46 (75%)	—	—	—	—	150
				0.81 (25%)	0.45 (25%)					
HiPIP <i>C. vinosum</i>	+2 (4.2 K)	—	—	1.14	0.43	—	—	—	—	151

Tabela II.5 (continuação)

Parâmetros usados para simular os espectros de Mössbauer de proteínas de ferro-enzofre.

Proteína (Organismo)	Estado de oxidação (Temp., K)	D (cm-1)	E/D	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	A (kG)			η (β)	Ref.
						A_x (g_x)	A_y (g_y)	A_z (g_z)		
[3Fe-4S]										
Ferredoxina II	+1 (15 K)	—	—	0.54	0.27	-197	-321	-321	1.0	18, 77
				0.54	0.27	211	117	117	1.0	
				0.54	0.27	26	26	26	1.0	
<i>D. gigas</i>	0 (4.2 K, 10 kG)	2.5	0.22	1.47 (66%)	0.46 (66%)	-160	-120	-120	0.4 (20)	18, 85
				-0.47 (33%)	0.30 (33%)	70	130	127	-2 (15)	
Ferredoxina II <i>A. vinelandii</i>	+1 (4.2 K)	—	—	0.63	0.27	-270	-306	-328	0.7	83
				0.63	0.27	124	124	124	0.7	
				≈ 0.6	≈ 0.3 - 0.4	≈ 4	≈ 4	≈ 4		

II.10 Bibliografia.

1. LeGall, J., Moura, J.J.G., Peck, H.D. Jr., e Xavier, A.V. (1982) "Iron-Sulfur Proteins" (ed. Spiro, T.G.) Vol. 4, págs. 177-248. Wiley, New York.
2. Odom, J.M., e Peck, H.D. Jr. (1984) *Ann. Rev. Microbiol.* **38**, 551-592.
3. LeGall, J., Fauque, G. (1988) "Biology of Anaerobic Microorganismes" (A.J.B. Zehnder, ed.), págs. 587-639, Wiley, New York.
4. LeGall, J., e Peck, H.D. Jr. (1987) *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 35-40.
5. Papavassiliou, P., e Hatchikian, E.C. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **810**, 1-11.
6. Probst, I., Moura, J.J.G., Moura, I., Bruschi, M., e LeGall, J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **502**, 38-44.
7. Lovenberg, W., e Sobel, B. E. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 193-199.
8. Lovenberg, W., e Williams, W.M. (1969) *Biochem.* **8**, 141-148.
9. Lode, E.T., e Coon, M.J. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 791-802.
10. Petersson, J. A., e Coon, M.J. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 329-334.
11. Petersson, J.A., Basu, D., e Coon, M.J. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 5162-5164.
12. Palmer, G. (1973) "Iron-Sulfur Proteins" (ed. Lovenberg, W.) **2**, 286-325.
13. Rao, K.K., Evans, M.C.W., Cammack, R., Hall, D.O., Thompson, C.L., Jackson, P.J., e Johnson, C.E. (1972) *Biochem. J.* **129**, 1063-1070.
14. Watenpaugh, K.D., Sieker, L.C., e Jensen, L.H. (1979) *J. Mol. Biol.* **131**, 509-522.
15. Frey, M., Sieker, L., Payan, F., Haser, R., Bruschi, M., Pepe, G., e LeGall, J. (1987) *J. Mol. Biol.* **197**, 525-541.
16. Sieker, L.C., Stenkamp, R.E., Jansen, L.H., Prickril, B., e LeGall, J. (1986) *FEBS Lett.* **208**, 73-76.
17. Adman, E. T., Sieker, L.C., e Jensen L.H. (1991) *J. Mol. Biol.* **217**, 337-352.

18. Moura, I.M.A.M.G. (1980) Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, U.N.L.
19. Moura, I., Teixeira, M., Xavier, A.V., Moura, J.J.G., Lespinat, P.A., LeGall, J., Berlier, Y.M., Saint-Martin, P., e Fauque, G. (1987) *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 106, 418.
20. Saint-Martin, P., Lespinat, P.A., Fauque, G., Berlier, Y., LeGall, J., Moura, I., Teixeira, M., Xavier, A.V., e Moura, J.J.G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9378-9380.
21. Mus-Veteau, I., Díaz, D., Gracia-Mora, J., Guigliarelli, B., Chottard, G., e Bruschi, M. (1991) *J. Inorg. Biochem.* 43, 659.
22. Moura, I., Bruschi, M., LeGall, J., Moura, J.J.G., e Xavier, A.V. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 1037-1044.
23. Bruschi, M., Moura, I., LeGall, J., Xavier, A.V., e Sieker, L.C. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 596-605.
24. Brumlik, M.J., LeRoy, G., Bruschi, M., e Voordouw, G., (1990) *J. of Bacteriol.* 172, 12, 7289-7292.
25. Moura, I., Huynh, B.H., Hausinger, R.P., LeGall, J., Xavier, A.V., e Münck, E. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2493-2498.
26. Moura, I., Xavier, A.V., Cammack, R., Bruschi, M., e LeGall, J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 533, 156-162.
27. Fee, J.A., e Palmer, G. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 245, 175-195.
28. Knoell, H.E., Knappe, J. (1974) *Eur. J. Biochem.* 50, 245-252.
29. Grabau, C., Schatt, E., Jouanneau, Y., Vignais, P.M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 3294-3299.
30. Fox, B.G., Froland, W.A., Dege, J.E., e Lipscomb, J.D. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 10023-10033.

31. Patel, R.N. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **252**, 229-236.
32. Fukuyama, K., Hase, T., Matsumoto, M., Tsukihara, T., Katsube, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Wada, K., e Matsubara, H. (1980) *Nature* **286**, 522-524.
33. Tsukihara, T., Fukuyama, K., Mizushima, M., Harioka, T., Kusunoki, M., Katsube, Y., Hase, T., e Matsubara, H. (1990) *J. Mol. Biol.* **216**, 399-410.
34. Rypniewski, W.R., Breiter, D.R., Benning, M.M., Wesenberg, G., Oh, B.-H., Markley, J.L., Rayment, I., Holden, H.M. (1991) *Biochem.* **30**, 4126-4131.
35. Cammack, R., Rao, K.K., Barger, C.P., Hutson, K.G., Andrew, P.W., e Rogers, L.J. (1977) *Biochem. J.* **168**, 205-209.
36. Palmer, G., Brintzinger, H., e Eatabrook, R.W. (1967) *Biochem.* **6**, 1658-1664.
37. Blumberg, W.E., e Peisach, J. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **162**, 502-512.
38. Sands, R.H., e Dunham, W.R. (1975) *Quarterly Reviews of Biophysics* **7**, 443-504.
39. Bertrand, P., Guigliarelli, B., e More, C. (1991) *New J. Chem.* **15**, 445-454.
40. Edwards, C.A., Bowyer, J.R., e Trumpower, B.L. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3705-3713.
41. Adam, Z., e Malkin, R. (1987) *FEBS Lett.* **225**, 67-71.
42. Beckmann, J.D., Ljungdahl, P.O., Lopez, J.L., e Trumpower, B.L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8901-8909.
43. Ensley, B.D., e Gibson, D.T. (1983) *J. Bacteriol.* **155**, 505-511.
44. Batie, C.J., LaHaie, E., e Ballou, D.P. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 1510-1518.
45. Irie, S., Doi, S., Yorifuji, T., Takagi, M., e Yano, K. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 5174-5179.
46. Zylstra, G., e Gibson, D.T. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14940-14946.
47. Fee, J.A., Kuila, D., Mather, M.W., e Yoshida, T. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **853**, 153-185.

48. Bernhardt, F.-H., Heymann, E., e Traylor, P.S. (1978) *Eur. J. Biochem.* **92**, 209-223.
49. Geary, P.J., Saboowalla, F., Patil, D., Cammack, R. (1984) *Biochem. J.* **217**, 667-673.
50. Gurbiel, R.J., Batie, C.J., Sivaraja, M., True, A.E., Fee, J.A., Hoffman, B.M., e Ballou, D.P. (1989) *Biochem.* **28**, 4861-4871.
51. Britt, R.D., Sauer, K., Klein, M.P., Knaff ... (1991) *Biochem.* **30**, 1892-1901.
52. Fee, J.A., Findling, K.L., Yoshida, T., Hille, R., Tarr, G.E., Hearshen, D.O., Dunham, W.R., Day, E.P., Kent, T.A., e Münck, E. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 124-133.
53. Fukuyama, K., nagahara, Y., Tsukihara, T., Katsube, Y., Hase, T., Matsubara, H. (1988) *J. Mol. Biol.* **199**, 183-193.
54. Lim, L.W., Shamala, N., Mathews, S., Steenkamp, D.J., Hamlin, R., e Xuong, N.H. (1986) *J. Biol. Chem* **261**, 15140-15146.
55. Breitner, D.R., Meyer, T.E., Rayment, I., e Holden, H.M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 18660-18667.
56. Stout, G.H., Turley, S., Sieker, L.C., e Jensen, L.H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1020-1022.
57. Beinert, H., Kennedy, M.C. (1989) *Eur. J. Biochem.* **186**, 5-15.
58. Bovier-Lapierre, G., Bruschi, M., Bonicel, J., e Hatchikian, E.C. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **913**, 20-26.
59. Conover, R.C., Kowal, A.T., Fu, W., Park, J.-B., Aono, S., Adams, M.W.W., e Johnson, M.K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 8533-8541.
60. Cammack, R. (1992) *Advances in Inorganic Chemistry* **38**, 281-322.
61. Asahara, H., Wistort, P.M., Bank, J.F., Bakerian, R.H., e Cunningham, R.P. (1989) *Biochem.* **28**, 4444-4449.

62. Carter, C.W., Jr, Kraut, J., Freer, S.T., Alden, R.A., Sieker, L.C., Adman, E., e Jensen, L.H. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 35-26-3529.
63. Carter, C.W., Jr. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 7802-7811.
64. Cammack, R. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 548-554.
65. Malkin, R. (1973) Iron-Sulfur Proteins (Ed. Lovenberg, W.), 1-26.
66. Bruschi, M., Hatchikian, E.C., LeGall, J., Moura, J.J.G., e Xavier, A.V. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **449**, 275-284.
67. Flatmark, T., e Dus, K. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **180**, 377-387.
68. Cammack, R., Rao, K.K., Hall, D.O., Moura, J.J.G., Xavier, A.V., Bruschi, M., LeGall, J., Deville, A., e Gayda, J.P. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **490**, 311-321.
69. Moulis, J.-M., Auric, P., Gaillard, J., e Meyer, J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 11396-11402.
70. Auric, P., Gaillard, J., Meyer, J., e Moulis, J.-M. (1987) *Biochem. J.* **242**, 525-530.
71. Noodleman, L. (1991) *Inorg. Chem.* **30**, 246-256.
72. Dunham, W.R., Hagen, W.R., Fee, J.A., Sands, R.H., Dunbar, J.B., e Humblet, C. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1079**, 253-262.
73. Bertini, I., Campos, A.P., Luchinat, C., Teixeira, (1993) *J. Inorg. Biochem.* **52**, 227-234.
74. Middleton, P., Dickson, D.P.E., Johnson, C.E., e Rush, J. (1978) *Eur. J. Biochem.* **88**, 135-141.
75. Lampreia, J., Moura, I., Teixeira, M., Peck, H.D., Jr., LeGall, J., Huynh, B.H., e Moura, J.J.G. (1990) *Eur. J. Biochem.* **188**, 653-664.
76. Thompson, C.L., Johnson, C.E., Dickson, D.P.E., Cammack, R., Hall, D.O., Weser, U., e Rao, K.K. (1974) *Biochem. J.* **139**, 97-103.
77. Huynh, B.H., Moura, J.J.G., Moura, I., Kent, T.A., LeGall, J., Xavier, A.V., Münck, E. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 3242-3244.

78. Armstrong, F.A., George, S.J., Cammack, R., Hatchikian, E.C., Thomson, A.J. (1989) *Biochem. J.* **264**, 265-273.
79. Moura, I., Moura, J.J.G., Huynh, B.H., Santos, H., LeGall, J., e Xavier, A.V. (1982) *Eur. J. Biochem.* **126**, 95-98.
80. Stout, C.D., Ghosh, D., Pattabhi, V., e Robbins, A.H. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1797-1800.
81. Stout, C.D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9256-9260.
82. Armstrong, F.A. (1992) *Advances in Inorganic Chemistry* **38**, 117-163.
83. Emptage, M.H., Kent, T.A., Huynh, B.H., Rawlings, J., Orme-Johnson, W.H., e Münck, E. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1793-1796.
84. Kent, T.A., Huynh, B.H., e Münck, E. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6574-6576.
85. Papaefthymiou, V., Girerd, J.-J., Moura, I., Moura, J.J.G., e Münck, E. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 4703-4710.
86. Bell, S.H., Dickson, D.P.E., Johnson, C.E., Cammack, R., Hall, D.O., e Rao, K.K. (1982) *FEBS Lett.* **142**, 143-146.
87. Kent, T.A., Dreyer, J.L., Kennedy, M.C., Huynh, B.H., Emptage, M.H., Beinert, H., e Münck, E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1096-1100.
88. Kent, T.A., Moura, I., Moura, J.J.G., Lipscomb, J.D., Huynh, B.H., LeGall, J., Xavier, A.V., e Münck, E. (1982) *FEBS Lett.* **138**, 55-58.
89. Thomson, A.J., Robinson, A.E., Johnson, M.K., Cammack, R., Rao, K.K., e Hall, D.O. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **637**, 423-432.
90. George, S.J., Armstrong, F.A., Hatchikian, E.C., e Thomson, A.J. (1989) *Biochem. J.* **264**, 275-284.
91. Moura, I., Moura, J.J.G., e Xavier, A.V. (1983) "Mobility and Recognition in Cell Biology" (ed. Sund, Veeger) pags. 83-101.

92. Moura, J.J.G., Moura, I., Kent, T.A., Lipscomb, J.D., Huynh, B.H., LeGall, J., Xavier, A.V., e Münck, E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 6259-6267.
93. Surerus, K.K., Münck, E., Moura, I., Moura, J.J.G., LeGall, J. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3805-3807.
94. Moura, I., Moura, J.J.G., Münck, E., Papaefthymiou, V., LeGall, J. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 349-351.
95. Conover, R.C., Park, J.-B., Adams, M.W.W., e Johnson, M.K. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4562.
96. Conover, R.C., Finnegan, M.G., Park, J.-B., Adams, M.W.W., Johnson, M.K. (1991) *J. Inorg. Biochem.* **43**, 245.
97. Hagen, W.R., Pierik, A.J., e Veeger, C. (1989) *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **85**, 4083-4090.
98. Moura, I., Tavares, P., Moura, J.J.G., Ravi, N., Huynh, B.H., Liu, M.-Y., e LeGall, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4489-4496.
99. Pierik, A.J., Hagen, W.R., Redeker, J.S., Wolbert, R.B.G., Boersma, M., Verhagen, M.F.J.M., Grande, H.J., Veeger, C., Mutsaers, P.H.A., Sands, R.H., Dunham, W.R. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 63-72.
100. Kim, J., e Rees, D.C. (1992) *Nature* **360**, 553-560.
101. Dean, D.R., Bolin, J.T., Zheng, L. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 6737-6744.
102. Smith, B.E., Eady, R.R. (1992) *Eur. J. Biochem.* **205**, 1-15.
103. Eady, R.R., Robson, R.L., Richardson, T.H., Miller, R.W., e Hawkins, M. (1987) *Biochem. J.* **244**, 197-207.
104. Müller, A., Schneider, K., Knüttel, K., Hagen, W.R. (1992) *FEBS Lett.* **303**, 36-40.
105. Pierik, A.J., Wassink, H., Haaker, H., e Hagen, W.R. (1993) *Eur. J. Biochem.* **212**, 51-61.

106. Surerus, K.K., Hendrich, M.P., Christie, P.D., Rottgardt, D., Orme-Johnson, W.H., e Münck, E. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8579-8590.
107. Hagen, W.R., Wassink, H., Eady, R.R., Smith, B.E., e Haaker, H. (1987) *Eur. J. Biochem.* **169**, 457-465.
108. Georgiadis, M.M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J.J., e Rees, D.C. (1992) *Science* **257**, 1653-1659.
109. Lindahl, P.A., Orme-Johnson, W.H., Kent, T.A., Day, E.P., Münck, E. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 11160-11173.
110. Hagen, W.R., Eady, R.R., Dunham, W.R., e Haaker, H. (1985) *FEBS Lett.* **189**, 250-251.
111. Watt, G.D., McDonald, J.W. (1985) *Biochem.* **24**, 7226-7231.
112. Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A.V., Dervartanian, D.V., LeGall, J., Peck, H.D., Jr., Huynh, B.H., e Moura, J.J.G. (1983) *Eur. J. Biochem.* **130**, 481-484.
113. Teixeira, M., Moura, I., Fauque, G., DerVartanian, D.V., LeGall, J., Peck, H.D., Jr., Moura, J.J.G., e Huynh, B.H. (1990) *Eur. J. Biochem.* **189**, 381-386.
114. Adams, M.W.W. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 115-145.
115. Huynh, B.H. (1994) *Methods in Enzymology*, "Inorganic Microbial Sulfur Metabolism", em impressão.
116. Ostrowski, J., Wu, J.Y., Rueger, D.C., Miller, B.E., Siegel, L.M., e Kredich, N.M. (1989) *J. Mol. Biol.* **264**, 15726.
117. McRee, D.E., Richardson, D.C., Richardson, J.S., e Siegel, L.M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 10277-10281.
118. Moura, I., LeGall, J., Lino, A.R., Peck, H.D., Jr., Fauque, G., Xavier, A.V., DerVartanian, D.V., Moura, J.J.G., e Huynh, B.H. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1075-1082.
119. Beinert, H., e Kennedy, M.C. (1993) *FASEB J.* **7**, 1442-1449.

120. Knaff, D.B., Hirasawa, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1056**, 93-125.
121. Moura, J.J.G., Xavier, A.V., Cammack, R., Hall, D.O., Bruschi, M., e LeGall, J. (1978) *Biochem. J.* **173**, 419-425.
122. Turner, N., Barata, B., Bray, R.C., Deistung, J., LeGall, J., e Moura, J.J.G. (1987) *Biochem. J.* **243**, 755-761.
123. Fox, B.G., Froland, W.A., Dege, J.E., e Lipscomb, J.D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10023-10033.
124. Ferreira, G.C., Franco, R., Lloyd, S.G., Pereira, A.S., Moura, I., Moura, J.J.G., Huynh, B.H. (1994) *J. Biol. Chem.*, em impressão.
125. Dailey, H.A., Finnegan, M.G., Johnson, M.K. (1994) *Biochem.* **33**, 403-407.
126. Eich, F., Geary, P.J., e Berhardt, F.H. (1986) *Eur. J. Biochem.* **153**, 407.
127. Aleman, V., Handler, P., Palmer, G., e Beinert, H. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 2560.
128. Cammack, R., Jackson, R.H., Cornish-Bowden, A., e Cole, J.A. (1982) *Biochem. J.* **207**, 333.
129. Anderson, G.L., e Hille, R. (1991) *J. Inorg. Biochem.* **43**, 577.
130. Jensen, L.H. (1987) "Iron-Sulfur proteins" (ed. Matsubara, H., Katsube, Y., e Wada, K.), pags. 3-21.
131. Lampreia, J., Pereira, A.S., Moura, J.J.G. (1994) *Methods in Enzymology*, "Inorganic Microbial Sulfur Metabolism", em impressão.
132. Huang, J.J., Kimura, T. (1973) *Biochem.* **12**, 406-409.
133. Barata, B.A.S., LeGall, J., Moura, J.J.G. (1993) *Biochem.* **32**, 11559-11568.
134. Kuila, D., Fee, J.A. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2768-2771.
135. Tomson, A.J., Breton, J., George, S.J., Butt, J.N., Armstrong, F.A., e Hatchikian, E.C. (1991) *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 594-599.
136. Adams, M.W. (1992) *Advances in Inorganic Chemistry* (ed. Cammack, R.) **38**, 341-396.

137. Pereira, M.A.S., Lampreia, J., LeGall, J., Moura, I., e Moura, J.J.G. (1991) *J. Inorg. Biochem.* **43**, 265.
138. Howard, J.B., Rees, D.C. (1991) *Advances in Protein Chemistry* (ed. Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M., Eisenberg, D.S.) **42**, 199-280.
139. Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A.V., Moura, J.J.G., LeGall, J., DerVartanian, D.V., Peck, H.D., Jr., e Huynh, B.H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16435-16450.
140. Mizrahi, I.A., Meyer, T.E., e Cusanovich, M.A. (1980) *Biochem.* **19**, 4727-4733.
141. Meyer, T.E., Przysiecki, C.T., Watkins, J.A., Bhattacharyya, A., Simonsen, R.P., Cusanovich, M.A. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6740-6744.
142. Münck, E., Debrunner, P.G., Tsibris, J.C.M., e Gunsalus, I.C. (1972) *Biochem.* **11**, 855-863.
143. Bray, R.C., Turner, N.A., LeGall, J., Barata, B.A.S., e Moura, J.J.G. (1991) *Biochem. J.* **280**, 817-820.
144. Fox, B.G., Hendrich, M.P., Surerus, K.K., Andersson, K.K., Froland, W.A., Lipscomb, J.D., e Münck, E. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3688-3701.
145. Fauque, G., Teixeira, M., Moura, I., Lespinat, P.A., Xavier, A.V., DerVartanian, D.V., Peck, H.D., Jr., LeGall, J., e Moura, J.J.G. (1984) *Eur. J. Biochem.* **142**, 21-28.
146. LeGall, J., Prickril, B.C., Moura, I., Xavier, A.V., Moura, J.J.G., e Huynh, B.H. (1988) *Biochem.* **27**, 1636-1642.
147. Schultz, C., e Debrunner, P.G. (1976) *J. Phys. Colloque* **37**, Supl. 12, 153-158.
148. Bill, E., Bernhardt, F.-L., Trautwein, A.X. (1981) *Eur. J. Biochem.* **121**, 39-46.
149. Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A.V., Dervartanian, D.V., LeGall, J., Peck, H.D., Jr., Moura, J.J.G., e Huynh, B.H. (1983) *J. Biol. Chem.* **264**, 16435-16450.
150. Kent, T.A., Emptage, M.H., Merkle, H., Kennedy, M.C., Beinert, H., Münck, E. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 6871-6881.

151. Middleton, P., Dickson, P.E.D., Johnson, C.E., e Rush, J.D. (1980) *Eur. J. Biochem.* **104**, 289-296.

Capítulo III.

**PROTEÍNAS CONTENDO CENTROS
BINUCLEARES DE FERRO.**

III. Proteínas contendo centros binucleares de ferro.	69
1. Introdução.	71
2. Hemeritrina.	72
3. A redutase de ribonucleotídeos.	76
4. A mono-oxigenase do metano.	81
5. Fosfatases ácidas púrpuras.	87
6. Bibliografia	98

III.1. Introdução.

Como foi possível verificar no capítulo anterior existem centros binucleares nos quais os dois átomos de ferro se encontram ligados entre si por átomos de enxofre lábil e possuem como outros ligandos da esfera de coordenação tetraédrica resíduos de cisteínas (centros do tipo [2Fe-2S]) e também histidinas (centros do tipo Rieske). Existe, no entanto, outro tipo de centros binucleares nos quais os dois ferros se encontram ligados entre si através de um átomo de oxigénio ou um grupo hidroxilo (ligando em ponte μ -oxo ou μ -hidroxilo).

O pequeno número de proteínas conhecidas que contém este tipo de centros apresentam uma variedade muito grande de funções, desconhecendo-se em alguns dos casos a sua verdadeira função biológica (ver tabela III.1). Em alguns casos, estas proteínas possuem funções semelhantes às exercidas por proteínas hémicas em organismos superiores, tais como o transporte e armazenamento de oxigénio molecular (hemoglobina e mioglobina) ou inserção de oxigénio em ligações C-H (citocromo P-450). Uma característica comum às proteínas para as quais foi possível identificar a sua função biológica (RNR, MMO e Hr) é a de ligarem oxigénio, embora os intermediários da activação do oxigénio tenham diferentes fins. Assim nas hemeritrinas o oxigénio liga-se reversivelmente ao centro, enquanto que na redutase de ribonucleotídeos o oxigénio é activado para a oxidação monoelectrónica de um resíduo de cisteína. Semelhantemente, na mono-oxigenase do metano o oxigénio é activado para a oxidação dielectrónica de um hidrocarboneto.

Foram já obtidas estruturas terciárias para três das proteínas referidas na tabela III.1. Os centros binucleares presentes nestas proteínas, apesar de semelhantes, apresentam diferenças significativas que serão discutidas de seguida. Os dados referentes à Rr de *D. vulgaris* serão analisados no capítulo V juntamente com a descrição do isolamento e caracterização da proteína análoga de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

Tabela III.1

Exemplos de proteínas que contêm centros binucleares de ferro com um átomo de oxigénio como ligando de ponte.

Proteína	Função	Organismo de onde foi isolada
Hemeritrina (Hr)	Transporte e armazenamento de oxigénio molecular.	Invertebrados marinhos (p.e. <i>Phascolopsis gouldii</i> , <i>Themiste zostericola</i> e <i>Themiste dyscrita</i>).
Redutase de ribonucleotídeos (RNR)	Promove a síntese de deoxiribonucleotídeos a partir dos respectivos ribonucleotídeos.	Animais, bactérias e células de mamíferos infectadas por viroses.
Mono-oxigenase do metano (MMO)	Promove a oxidação do metano a metanol.	Bactérias metanotróficas (p.e. <i>Methylococcus capsulatus</i> e <i>Methylosinus trichosporium</i>)
Fosfatases ácidas púrpuras (PAP)	Função biológica desconhecida. Catalisa a hidrólise de ésters de fosfato em meio ácido (pH ~ 5-6)	Mamíferos, plantas e bactérias (p.e. Uteroferrina isolada de porco)
Rubreritrina (Rr)	Função desconhecida.	Bactérias redutoras de sulfato (<i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 e <i>D. vulgaris</i>)

III.2. Hemeritrina.

A hemeritrina foi descrita pela primeira vez à cerca de 170 anos, tendo-se tornado na primeira proteína em que foi evidenciada a existência de um centro binuclear de ferro com um átomo de oxigénio como ligando de ponte (ponte μ -oxo). A hemeritrina é a proteína responsável pelo transporte e armazenamento de oxigénio em alguns invertebrados marinhos¹. A proteína funcional pode ser monomérica (miohemeritrina) ou oligomérica (normalmente octamérica, mas podendo estar presente nas formas di, tri e tetramérica). Contém um único centro binuclear por cada cadeia polipeptídica, estando a massa molecular dessa cadeia compreendida entre os 13 e os 15 kDa.

No estado de oxidação designado por met-hemeritrina, o centro encontra-se completamente oxidado (ambos os ferros estão no estado férrico). Da estrutura de raios-X desta forma pode-se verificar que os dois ferros têm números de coordenação diferentes². Um dos ferros (Fe1) é coordenado octaédricamente por três histidinas, um aspartato, um glutamato e um átomo de oxigénio (ponte μ -oxo). Estes três últimos ligandos são partilhados com o segundo átomo de ferro (Fe2), que possui ainda duas outras histidinas como ligandos (ver figura III.1). Apesar de o Fe2 ser pentacoordenado, a geometria de coordenação é semelhante a uma geometria octaédrica na qual um dos sítios de ligação está vazio, diferindo portanto da maior parte dos centros monoméricos pentacoordenados, onde a geometria de coordenação é bipiramidal trigonal. Uma prova que indica que ambos os ferros possuem um ambiente electrónico semelhante é o facto de no espectro de Mössbauer da met-hemeritrina apenas se observar um dobleto de quadrupolo³. Os parâmetros obtidos ($\Delta E_Q = 1.57$ mm/s e $\delta = 0.46$ mm/s, a 77K)⁴ são característicos de ferro férrico de alto spin, confirmando que na met-hemeritrina ambos os ferros estão na forma oxidada. Esta forma da proteína é silenciosa em RPE pois o centro está num estado diamagnético ($S = 0$) resultante do facto dos dois ferros (cada um com $S = 5/2$) estarem acoplados antiferromagneticamente⁵. Apesar da met-hemeritrina não ligar oxigénio molecular, tem a capacidade de ligar outras moléculas como por exemplo a azida (azidomet-hemeritrina)⁶, cianeto, tiocianato e cloreto⁷.

Só no estado completamente reduzido, designado por deoxi-hemeritrina, é que o centro tem a capacidade de ligar uma molécula de oxigénio. Neste estado o centro binuclear é silencioso em RPE e apresenta um único dobleto de quadrupolo no espectro de Mössbauer com parâmetros típicos de ferro ferroso de alto spin ($\Delta E_Q = 2.89$ mm/s e $\delta = 1.20$ mm/s, a 4.2 K)^{3,7}. Também neste caso uma das posições de coordenação do Fe1 está vazia. O acoplamento é bastante inferior que o observado na met-hemeritrina, pois a constante de acoplamento é cerca de 90% menor.

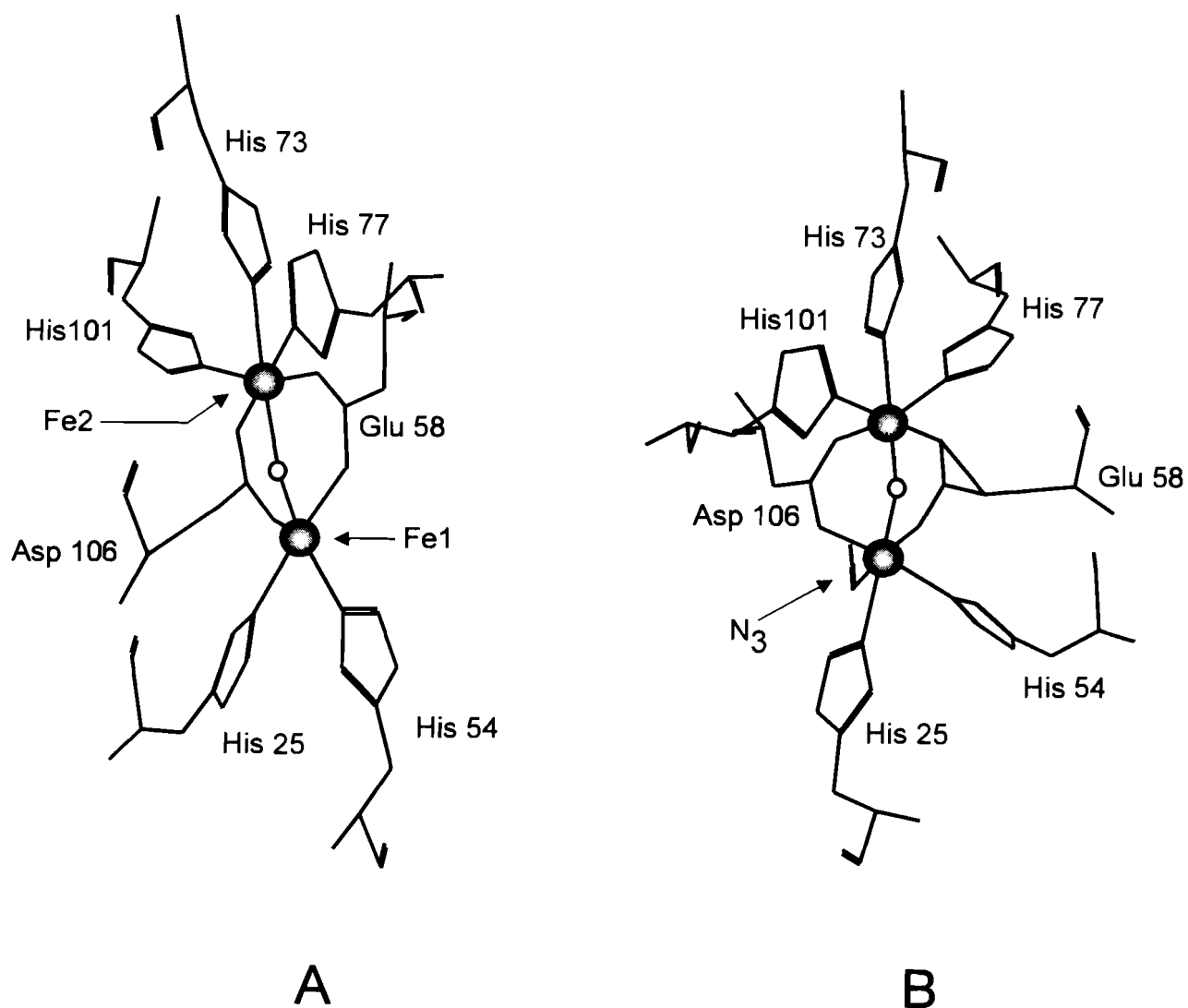


Figura III.1 - Estrutura obtida pela cristalografia de raios-X para duas diferentes formas da hemeritrina: (A) met-hemeritrina e (B) azidomet-hemeritrina.

O oxigênio liga-se ao FeI formando o que se convencionou chamar de oxi-hemeritrina, ocupando o sítio vazio na esfera de coordenação e tornando este ferro hexacoordenado (ver figura III.1). A nível estrutural, as diferenças entre a oxi-hemeritrina e a azidomet-hemeritrina são praticamente nulas⁸. No espectro de Mössbauer é possível ver agora dois dobletos de quadrupolo de igual intensidade com o mesmo desvio isomérico. Para a oxi-hemeritrina os parâmetros são os seguintes: $\Delta E_Q = 1.92$ mm/s e $\delta = 0.54$ mm/s; $\Delta E_Q = 1.09$ mm/s e $\delta = 0.51$ mm/s^{3,7}. A constante de acoplamento é, neste caso, 40% menor que para a met-hemeritrina.

A redução monoelectrónica da met-hemeritrina (semi-met_R) e a oxidação monoelectrónica da deoxi-hemeritrina (semi-met_O) produzem diferentes espécies paramagnéticas. Em qualquer dos casos um ferro férrico de alto spin ($S = 5/2$) está acoplado a um ferro ferroso de alto spin ($S = 2$), resultando desse acoplamento uma espécie paramagnética com $S = 1/2$. Ambas as espécies apresentam sinais de RPE rômnicos, a 10 K, com os seguintes valores de g: 1.96, 1.88 e 1.67 (semi-met_R); 1.95, 1.72 e 1.68 (semi-met_O)⁹.

Foram também obtidos aductos entre o óxido nítrico e o centro binuclear nos estados de oxidação diferrosos e semireduzidos (na presença e ausência de fluoreto)¹⁰. Estes aductos apresentam espectros de RPE típicos de sistemas com $S = 1/2$. Conjuntamente com dados da espectroscopia de Mössbauer, estes sinais foram interpretados como provenientes do acoplamento antiferromagnético entre um ferro ferroso ($S = 2$) e uma espécie $\{FeNO\}^7$ ($S = 3/2$), resultando num spin efectivo $S = 1/2$.

É possível substituir a ponte μ -oxo entre os dois ferros por uma ponte μ -sulfido por incubação da met-hemeritrina com sulfureto (S^{2-}) em condições anaeróbicas¹¹. A espécie assim produzida, chamada de semi-metsulfuretohemeritrina, contém um ferro férrico e outro ferroso. O espectro de Mössbauer apresenta dois dobletos de quadrupolo com os seguintes valores: $\Delta E_Q = 1.58$ mm/s e $\delta = 0.58$ mm/s (ferro férrico); $\Delta E_Q = 2.43$ mm/s e $\delta = 1.14$ mm/s (ferro ferroso). O espectro de RPE apresenta ressonâncias a g = 1.88, 1.71 e 1.4, típicas de um sistema com acoplamento antiferromagnético ($S = 1/2$). Por oxidação com ferricianeto de potássio obtém-se a espécie totalmente oxidada. Esta espécie apresenta no espectro de

Mössbauer um único dobleto de quadrupolo ($\Delta E_Q = 0.99$ mm/s e $\delta = 0.50$ mm/s) e é silenciosa em RPE, factos que são indicativos desta espécie ser equivalente no seu estado de oxidação à met-hemeritrina. O espectro de visível da metsulfuretohemeritrina apresenta bandas de transferência de carga $S^{2-} \rightarrow Fe^{3+}$ entre 400 e 600 nm (ver tabela III.6).

Recentemente foi possível proceder à reconstituição dos centros binucleares da hemeritrina e da miohemeritrina¹². Os produtos maioritários dessa reconstituição são respectivamente a oxi-hemeritrina e a oximiohemeritrina. A reconstituição tem um rendimento de aproximadamente 87% para a oximiohemeritrina e, aparentemente, a totalidade dos centros parece ser funcional. Contrastando com este facto, na oxi-hemeritrina reconstituída, aproximadamente 30% dos centros não tem capacidade para ligar moléculas de oxigénio à pressão ambiente (dados de espectroscopia de Mössbauer revelaram que o ferro se encontra num ambiente bastante semelhante, mas não igual, ao ferro na proteína nativa).

III.3. A redutase de ribonucleotídeos.

Os desoxiribonucleotídeos são os blocos essenciais à construção das moléculas de DNA. Estes são sintetizados por redução dos ribonucleotídeos correspondentes. Esta redução ocorre com retenção da configuração pela substituição do grupo hidroxilo do carbono 2' por um protão proveniente do solvente (ver figura III.2). O redutor é um grupo ditiol pertencente a uma proteína pequena, tal como a tioredoxina ou a glutaredoxina.

As enzimas que catalisam esta reacção são denominadas de redutases de ribonucleotídeos (RNR)^{13,14,15}. Estas enzimas dividem-se em três classes estruturalmente distintas (ver tabela III.2). No entanto, o comportamento alostérico bem como a regulação destas enzimas é altamente conservada nos diversos organismos, sugerindo que todas elas evoluíram a partir de um ancestral comum. Destas três classes de enzimas, apenas as pertencentes à classe I possuem um centro binuclear de ferro, que contém um ligando μ -oxo, estabelecendo a ponte entre os átomos de ferro. Dentro da classe I a RNR melhor estudada é a isolada de extractos celulares (crescidos aerobicamente) de *E. coli*.

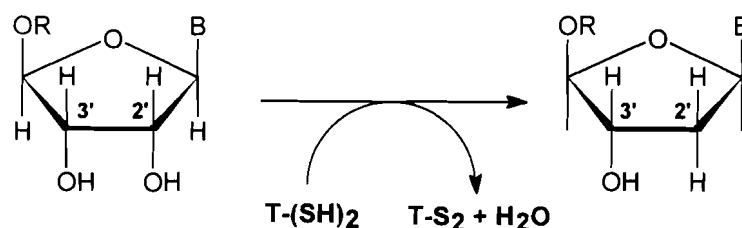


Figura III.2 - Reacção de redução dos ribonucleotídeos. R= PPi (enzimas da classe I) ou PPPi (enzimas da classe II e III).

A RNR de *E. coli* é um tetrâmero composto por duas subunidades iguais, B1 e B2 (por vezes também designadas de R1 e R2). Ambas as subunidades foram já clonadas e expressadas separadamente. A subunidade B1 é a subunidade maior, de massa molecular igual a 172 kDa. Esta subunidade é constituída por duas cadeias polipeptídicas equivalentes (com 85.7 kDa) que contêm o sítio de ligação do substrato, com os tióis que participam na redução da ribose, e dois sítios alostéricos. Por sua vez, a subunidade B2 (87 kDa) é constituída por duas cadeias polipeptídicas com a massa molecular de 43.4 kDa. É esta subunidade que contém os centros binucleares de ferro e ainda um radical de tirosina¹⁶.

Só no fim da década de 80 é que foi determinado com rigor o número de centros binucleares existente em cada subunidade (ver tabela III.5). Até então as determinações do conteúdo em ferro estabeleciam como verdadeiro a existência de um único centro binuclear por subunidade^{17,18}. Devido ao facto de a subunidade B1 ser constituída por duas cadeias polipeptídicas, e por razões de simetria, este único centro seria partilhado por essas mesmas duas cadeias. Na verdade, e após correcta determinação do conteúdo em ferro, verificou-se que existem 4 átomos de ferro por subunidade B2, o que implica dois centros binucleares por subunidade¹⁹.

Tabela III.2

Classes de redutases de ribonucleotídeos.^{14,15}

Classe	Organismo	Composição de subunidades	Cofactores
I	<i>E. coli</i>	$\alpha_2\beta_2$ ou B1B2	Centro binuclear de ferro, Radical de tirosina
II	<i>Lactobacillus leichmannii</i>	α	Adenosilcobalamina, Radical da proteína
III	<i>E. coli</i> (células crescidas anaerobicamente)	dA3 (β_2)	Centro de ferro-enxofre (Fe ₄ S ₄ ?) S-adenosilmetionina, Radical da proteína ^{20,21}

A subunidade B2, no estado diférrico do centro, apresenta um espectro de visível com picos a 325, 370, 410 e 600 nm bem como um ombro a 390 nm¹⁷. Após tratamento com hidroxíureia, reagente que inactiva a subunidade B2 e concomitantemente destrói o radical, o pico a 410 nm e o ombro a 390 nm desaparecem. O restante espectro é atribuído ao centro binuclear e apresenta forte semelhança com o espectro da met-Hr (ver tabela III.6). O espectro de Mössbauer da proteína neste estado de oxidação apresenta dois doublets de quadrupolo de igual intensidade (ver tabela III.8)^{18,19}. O desvio isomérico é típico de ferro férrico de spin alto, enquanto que os valores obtidos para o desdobramento de quadrupolo são consistentes com a presença de uma ponte μ -oxo. Contrariamente ao observado para a met-hemeritrina, o facto de existirem dois doublets de quadrupolo revela que os ferros que constituem o centro possuem ambientes diferentes. Esta diferença não é dependente da existência do radical uma vez que as propriedades dos átomos de ferro não se modificam por redução do radical¹⁹.

A recente determinação da estrutura da RNR de *E. coli* vem confirmar estes dados²². A elevada resolução dos dados obtidos permite obter uma descrição exacta da estrutura do centro binuclear (ver figura III.3). Foi possível verificar que existem dois centros binucleares,

um em cada cadeia polipeptídica, que distam entre si cerca de 25 Å. Vários detalhes distinguem este centro do centro binuclear da Hr. Assim, com excepção de um único resíduo de histidina, todos os ligandos do ferro são grupos carboxílicos em oposição ao facto de na Hr todos os ligandos terminais serem resíduos de histidina. Existem ainda como ligandos do centro, duas moléculas de água (uma por cada ferro) e uma ponte μ -oxo. Outra particularidade existente nesta estrutura é o facto de apesar de ambos os ferros possuírem uma esfera de coordenação octaédrica, um deles é coordenado pelos dois oxigénios de um grupo carboxílico pertencente a um resíduo de aspartato. Esta coordenação anómala pode induzir diferentes gradientes de campo eléctrico para cada um dos ferros, o que explica o facto de se terem observado dois diferentes doubletos de quadrupolo no espectro de Mössbauer. Finalmente, pode-se extrair outra conclusão importante desta estrutura. Contrariamente ao que acontece na Hr, existem apenas dois ligandos que estabelecem a ligação em ponte dos átomos de ferro. Isto poderá significar que o centro é, neste caso, menos rígido nas ligações entre os átomos de ferro. Uma possível compensação será dada por uma intrincada rede de pontes de hidrogénio que envolvem os dois resíduos de histidina coordenada ao ferro e dois outros resíduos da cadeia polipeptídica (ver figura III.3).

O espectro de Mössbauer do estado totalmente reduzido do centro binuclear apresenta apenas um doubleto de quadrupolo com parâmetros típicos de ferro ferroso de spin alto (ver tabela III.8)¹⁹. Estes parâmetros são também muito semelhantes aos obtidos para o centro binuclear presente na mono-oxigenase do metano. O facto de apenas existir um doubleto de quadrupolo leva a pensar que o ambiente dos ferros no centro é bastante semelhante. Esta observação é estranha, se pensarmos que é o facto de um deles possuir um ligando bidentado que promove a distinção no estado diférrico. Assim, para que no estado totalmente reduzido ambos os ferros tenham a mesma distorção, ou um deles perdeu a distorção ou outro ganhou uma distorção semelhante. Em qualquer dos casos, aparentemente uma mudança na esfera de coordenação dos átomos de ferro acompanhou a redução do centro.

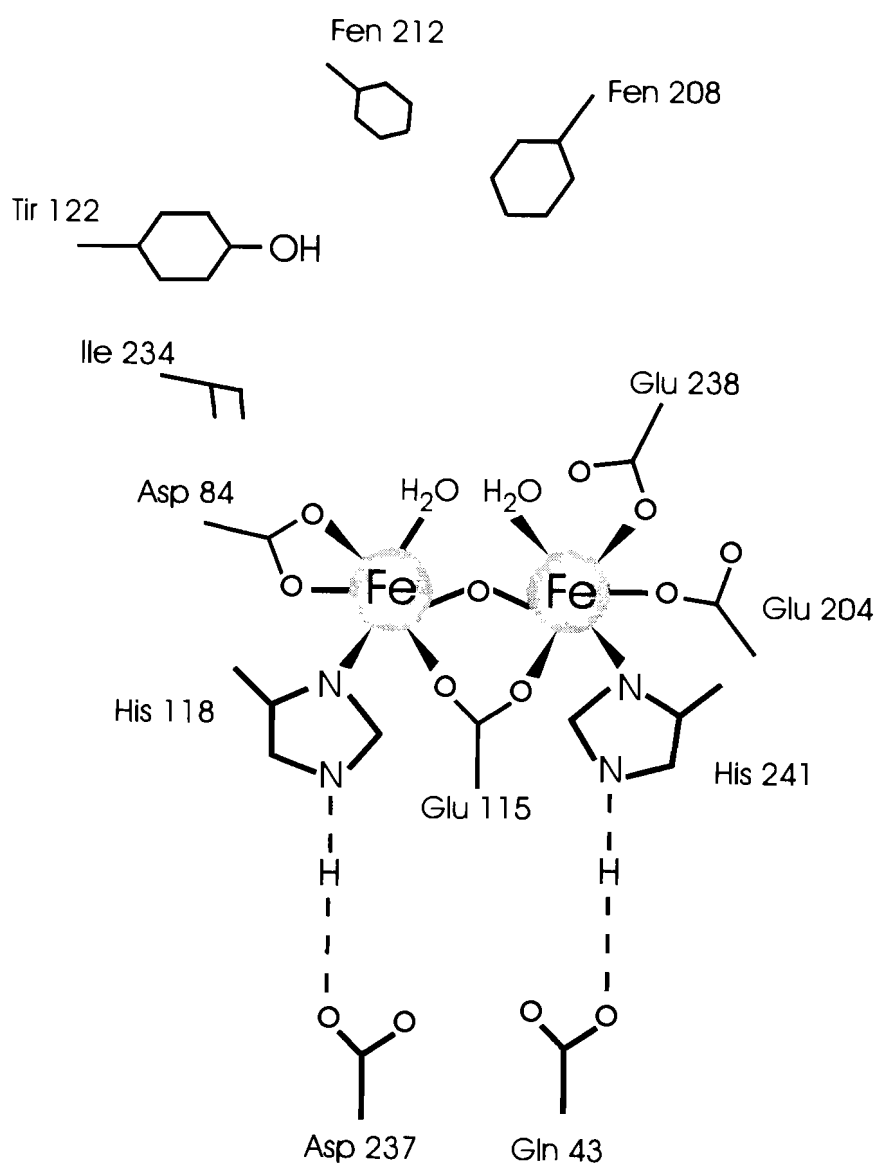


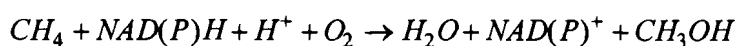
Figura III.3 - Representação gráfica da estrutura obtida através da cristalografia de raios-X para o centro binuclear da RNR (adaptado da referência 22).

O espectro de Mössbauer, neste estado diferroso, adquirido a campos magnéticos elevados contém consideráveis interações magnéticas hiperfinas. A análise preliminar desses espectros sugere que ambos os sítios são equivalentes e que se encontram ferromagneticamente acoplados (embora a magnitude da constante de acoplamento seja baixa). Por outro lado o espectro de RPE apresenta uma ressonância a campo baixo, no qual

a forma do sinal é dependente da potência aplicada. Tal comportamento foi também observado em sinais originários de sistemas com spin inteiro.

III.4. A mono-oxigenase do metano.

A mono-oxigenase do metano (MMO) é um complexo enzimático isolado de bactérias metanotróficas responsável pelo primeiro passo da via metabólica, que permite a estas estirpes utilizar o metano como fonte de carbono e energia. A reacção catalisada por este complexo enzimático é a seguinte:



O metanol produzido nesta reacção é oxidado a formaldeído e dióxido de carbono, que posteriormente é assimilado por uma de duas vias metabólicas dependendo do tipo de bactéria metanotrófica. Para além do metano este complexo pode também usar outros substratos tais como *n*-alcenos, *n*-alcanos, éteres e compostos aromáticos heterocíclicos^{23,24}.

Este complexo foi já observado associado à membrana celular (complexo contendo cobre) e na forma solúvel. No entanto apenas foi isolado nesta última forma. A MMO solúvel foi isolada e caracterizada de três bactérias metanotróficas: *Methylococcus capsulatus* (Bath)²³, *Methylosinus trichosporium* OB3b²⁵ e *Methylobacterium* sp. CRL-26^{26,27}. O complexo enzimático é composto por três diferentes proteínas^{25,28}: i) A hidroxilase nomeada de componente A; ii) Uma proteína regulatória nomeada por componente B e iii) A redutase nomeada de componente C.

O componente B é uma proteína pequena cuja massa molecular é igual a 15.7 ou 15.8 kDa, respectivamente, para *M. capsulatus*^{28,29} e para *M. trichosporium*²⁵. A proteína não possui qualquer grupo prostético. Tem como função regular a actividade da MMO solúvel, possuindo a capacidade de converter a enzima de oxidase em oxigenase. Na ausência desta proteína o complexo formado pelos componentes A e C promove a redução do oxigénio molecular a água. A presença do componente B inibe esta actividade, assim como a transferência electrónica entre a redutase e a hidroxilase. Na presença de um substrato, por

exemplo CH_4 , o complexo adquire então a função de oxigenase, sendo restabelecida a transferência electrónica inter-proteínas ²⁹.

A redutase é também constituída por uma única cadeia polipeptídica com massa molecular igual a 44.6 e 38.3 kDa, respectivamente, para *M. capsulatus* ²⁸ e para *M. trichosporium* ²⁵. Esta proteína contém como cofactores um agregado de [2Fe-2S] e uma unidade FAD. A sua actividade é dependente do NAD(P)H, cuja função é promover a redução da hidroxilase após cada ciclo de catálise.

De maior interesse para este capítulo é a hidroxilase. Este componente é composto por duas cópias de três diferentes cadeias polipeptídicas, $(\alpha\beta\gamma)_2$. Apesar destas cadeias variarem entre as diferentes MMO a composição da hidroxilase é sempre igual. A hidroxilase de *M. capsulatus* ^{28,30} tem uma massa molecular igual a 226 KDa (54, 42 e 17 kDa, respectivamente para α , β e γ). A mesma componente em *M. trichosporium* ²⁵ possui a massa molecular de 241 kDa (54.4, 43.0 e 22.7 kDa, para α , β e γ respectivamente). A subunidade α possui um centro binuclear semelhante ao encontrado na RNR ou na Hr. Foi também provado que é esta subunidade que interacciona com o substrato ³¹, facto que leva a acreditar que o centro binuclear esteja directamente envolvido na catálise.

O espectro de UV-visível das diferentes hidroxilases é bastante semelhante (ver tabela III.6). Todas elas possuem um máximo de absorvância por volta dos 280 nm, e diminuição constante para os comprimentos superiores. Duas das hidroxilases contêm ainda outras bandas na região visível do espectro. A hidroxilase de *M. capsulatus* possui ainda um ombro aos 406-410 nm, que é perdido por redução com ditionito de sódio. Também a hidroxilase isolada de *Methylobacterium* sp. CRL-26 possui um pico de absorvância a 408 nm. No entanto este pico não é perdido por adição de ditionito de sódio. O espectro da proteína reduzida não apresenta picos a 521 ou 551, sendo o conteúdo em hemo da proteína negligenciável, razões para que o pico a 408 nm não seja atribuído a contaminantes hémicos.

Tabela III.3

Propriedades físicas das mono-oxigenases do metano.

	<i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath) ²⁵	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b ²⁵	<i>Methylobacterium</i> sp. CRL-26 ^{25,26,27}
Hidroxilase			
Composição de subunidades	($\alpha\beta\gamma$) ₂	($\alpha\beta\gamma$) ₂	($\alpha\beta\gamma$) ₂
Massa molecular (kDa)			
SDS-Page	241	226	230
Filtração em gel	245	210	220
Sedimentação	245	---	225
Subunidade α	54.4	54	55
Subunidade β	43.0	42	40
Subunidade γ	22.7	17	20
Conteúdo em ferro	4.3	2.3	2.8
Componente B			
Massa molecular (kDa)			
SDS-Page	15.8	15.7	---
Filtração em gel	15-31	17	---
Sedimentação	15.1	---	---
Redutase			
Massa molecular (kDa)			
SDS-Page	39.7	39	40
Filtração em gel	38.3	44.6	40
Sedimentação	38.4	---	38
FAD	1	1	1
Conteúdo em ferro	2	2	2
Enxofre lábil	2	2	2

O espectro de RPE da hidroxilase no estado oxidado apresenta ressonâncias a $g = 4.3$ (ferro adventício) e a $g = 2.01$ (espécie radicalar)^{25,30,32,33}. Por redução (quer com ditionito de sódio durante um período de tempo curto ou por adição equimolar de NADH na presença de quantidades catalíticas de redutase) obtém-se uma espécie rômica com valores de g inferiores a 2.0 (ver tabela III.7)^{25,33}. Este sinal pode ser atribuído ao estado semireduzido (Fe^{2+} , Fe^{3+}) no qual um acoplamento antiferromagnético é responsável pelo aparecimento de uma espécie com $S = 1/2$. A redução completa do centro binuclear dá origem a um sinal a $g = 15$ ^{25,34}. A comparação de espectros de RPE (usando a hidroxilase de *M. trichosporium*³⁵) adquiridos com o campo da micro-onda paralelo ou perpendicular ao campo magnético estático demonstrou que este sinal provém de um spin inteiro, muito provavelmente de um $S = 4$ devido ao acoplamento ferromagnético dos ferros ferrosos.

O espectro de Mössbauer da hidroxilase de *M. trichosporium*, bem como o da hidroxilase de *M. capsulatus*, na forma oxidada revela que estamos na presença de um número par de ferros férricos de spin alto acoplados antiferromagneticamente, dando origem a uma espécie com $S = 0$ ^{33,55}. A total redução da amostra produz um espectro característico de ferros ferrosos de spin alto, existindo alguma evidência para que estes ferros estejam acoplados.

Durante a catálise o centro binuclear passa do estado de oxidação diferroso (Fe^{2+} , Fe^{2+}) ao estado diférrico (Fe^{3+} , Fe^{3+}). Durante este ciclo, formam-se diversos intermediários (ver figura III.4). Recentemente foi isolado um novo intermediário, denominado composto Q, detectado durante o estudo cinético da reacção entre a hidroxilase reduzida e o oxigénio molecular, na presença do componente B (*M. trichosporium*). Para tal foram usadas técnicas de "rapid freeze quenching" acopladas à espectroscopia de Mössbauer. O composto Q, apresenta parâmetros que levam a pensar que se está na presença do estado $Fe(IV)$ - $Fe(IV)$ do centro^{36,37}.

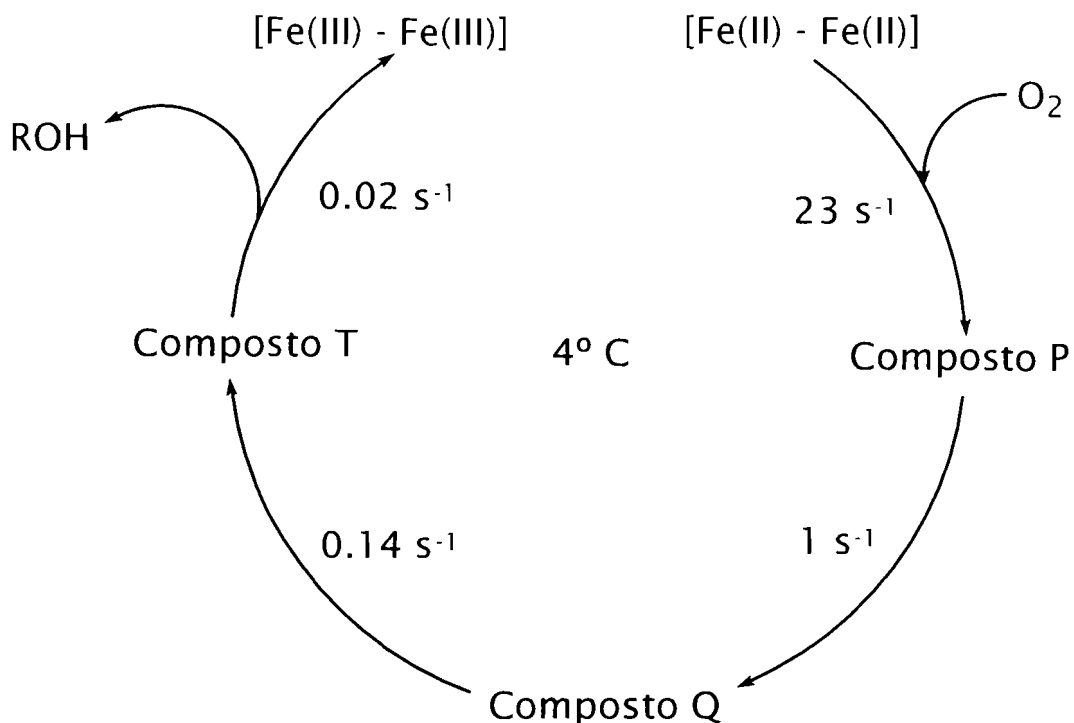
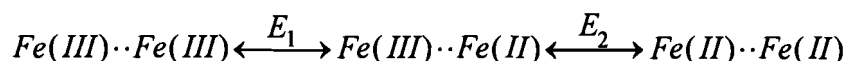


Figura III.4 - Intermediários reactivos detectados durante um ciclo catalítico da hidroxilase da MMO (adaptado da referência 37). R = nitrobenzeno.

Os dados obtidos inicialmente para a determinação do conteúdo em ferro apontavam para o facto de existir apenas um centro binuclear por hidroxilase. Por uma questão de simetria admitiu-se que o centro binuclear estaria envolvido na ligação das duas subunidades. No entanto verificou-se que, para a hidroxilase de *M. trichosporium*, a actividade específica aumentava com o aumento do número de ferros, sendo máxima para amostras contendo 4 átomos por molécula de hidroxilase ²⁵. Verificou-se também que para estas amostras o espectro de Mössbauer apresentava cerca de 2 centros binucleares por hidroxilase e que a ressonância a $g=15$ no espectro de RPE tinha a amplitude máxima. Estes factos

levaram a questionar os dados anteriormente obtidos na quantificação do conteúdo em ferro a admitir como verdadeira a hipótese de existência de um centro binuclear por subunidade α .

Na tabela III.4 apresentam-se os valores de potenciais redox para este centro calculados aplicando o seguinte modelo a dados de titulações redox nas quais se seguiu a intensidade do sinal de RPE em função do potencial:



O resultado mais interessante destas titulações é o facto de, na ausência de substrato, a adição do componente B e da redutase impede a redução do centro. Contrariamente, se conjuntamente com estes dois últimos componentes se introduzir um substrato (neste caso o propileno) observa-se que a forma totalmente reduzida do centro é obtida a potenciais bastante altos, favoráveis à oxidação do metano. A regulação deste complexo deve, portanto, ser efectuada também por factores como a presença/ausência do meio reaccional do substrato ou do componente B.

Tabela III.4
Potenciais redox do centro binuclear para hidroxilases de duas diferentes mono-oxigenases do metano

Adições à mistura reaccional	<i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath) ^{34,32}		<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b ³⁸	
	E ₁ (mV)	E ₂ (mV)	E ₁ (mV)	E ₂ (mV)
Sem adições	+48	-135	+76	+21
	+350±25	-25±25		
Propileno	+30	-156	—	—
Componente B, Propileno	Não foi observada redução		—	—
Componente B, Redutase, Propileno	>150	>150	—	—

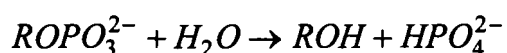
O alinhamento da cadeia polipeptídica das hidroxilases *M. capsulatus* (Bath) e *M. trichosporium* OB3b com a estrutura obtida para a proteína B2 (RNR) levaram a que se estabelecesse um modelo para a ligação ao centro (ver figura III.5)^{39,40}. Segundo este modelo

a substituição dos resíduos Tir(122), Fen(208) e Fen(212) (ligandos da B2) por resíduos menores como sejam a Cis(151), a Tre(213) e a Ile(217) (ligandos da MMO) sugere que o sítio activo na MMO é mais aberto do que o sítio de ligação do oxigénio na RNR. Estes dados estão de acordo com o facto de a MMO utilizar como substrato, não só o metano, mas também substratos mais volumosos. Em consonância com esta observação estão dados provenientes das espectroscopias de RPE, Mössbauer e Ressonância de Raman que indicam que fenóis (*p* ou *m* substituídos) têm a possibilidade de se ligar ao centro binuclear e que essa ligação não implica a perda do acoplamento antiferromagnético⁴¹.

O modelo para a estrutura do centro obtido pela cristalografia de raios-X não é explícito quanto à natureza do ligando de ponte entre os dois ferros. Recentemente, dados da espectroscopia de ENDOR, substanciados também por resultados de EXAFS, levam a acreditar que se trata de uma ponte μ -hidroxo e que existe ainda um ligando hidroxo coordenado a um dos ferros (ver figura III.6)⁴².

III.5. Fosfatases ácidas púrpuras.

Existe uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise de alguns ésters de fosfato em condições ligeiramente ácidas:



Estas enzimas podem ser distinguidas de outras com igual actividade por não serem inibidas pelo tartarato, pelo sua massa molecular (30 a 40 kDa) e alto ponto isoeléctrico. Outra característica destas enzimas é a sua cor púrpura. É este facto, conjuntamente com a catálise que promovem, que faz com que esta classe de enzimas seja denominada por fosfatases ácidas púrpuras (PAP)⁴³.

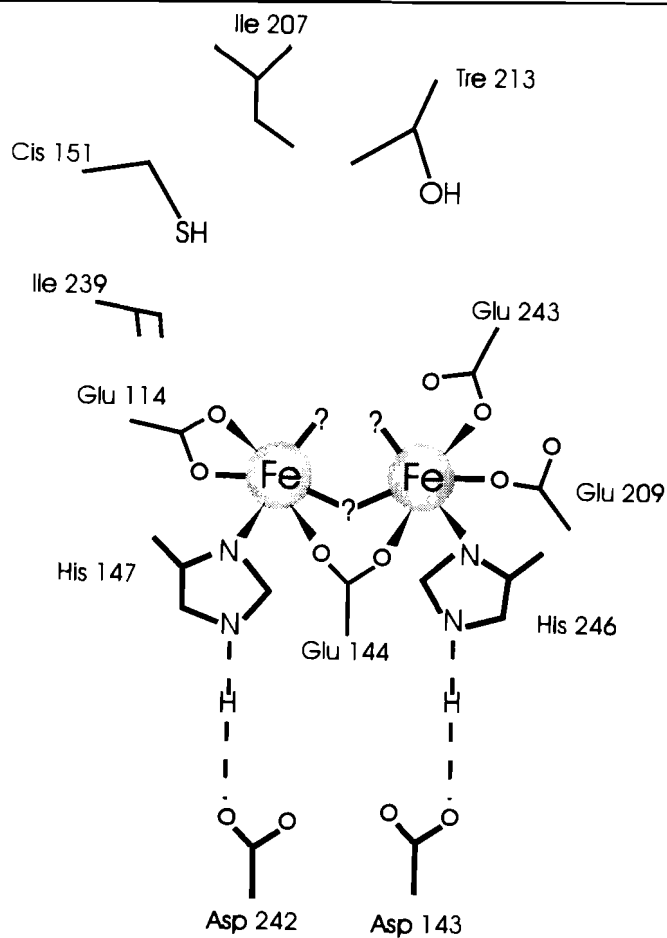


Figura III.5 - Modelo proposto por Nordlund e colaboradores para a coordenação do centro binuclear presente na hidroxilase da MMO (adaptado da referência 40).

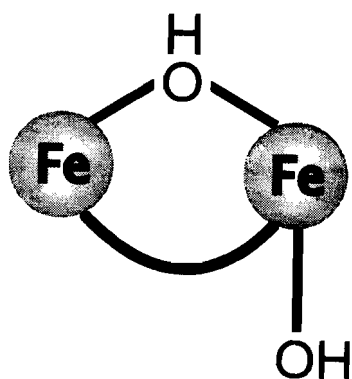


Figura III.6 - Modelo proposto por DeRose e colaboradores para a coordenação parcial do centro binuclear presente na hidroxilase da MMO (adaptado da referência 42).

Estas enzimas foram isoladas de diversos tecidos animais, tendo sido melhor estudada a proteína isolada de baço de boi. Localizam-se normalmente nos lisossomas. Uma excepção é a uteroferrina, isolada do fluido uterino de porco onde se torna bastante abundante durante a gravidez. A sua função fisiológica não está esclarecida. No caso da uteroferrina uma função de transporte e/ou transferência de ferro pode ter alguma relevância fisiológica⁴⁴.

Uma característica comum a todas as PAP é o facto de conterem um centro binuclear de ferro. Tal como nos exemplos atrás citados, a presença de ferro nestas enzimas esteve sujeita a bastante controvérsia. Inicialmente vários autores consideraram que quer a uteroferrina quer a PAP isolada de baço de boi, continham apenas um átomo de ferro por cadeia polipeptídica^{45,46}. No entanto, foi posteriormente determinado para estas duas enzimas que o valor correcto do conteúdo em ferro é 2 átomos por cadeia polipeptídica (ver tabela III.5)^{47,48}.

Existem dois estados de oxidação possíveis. No estado totalmente oxidado ambos os ferros são férricos e a proteína possui uma cor púrpura (forma "purple"). Neste estado a proteína está inactiva e o seu espectro de UV-visível apresenta um máximo entre os 545 e os 550 nm. O espectro de Mössbauer é constituído por dois doubletos de quadrupolo com parâmetros semelhantes aos obtidos para a forma diférrica do centro binuclear da RNR (ver tabela III.8)⁴⁹. Conjuntamente com dados obtidos por magnetização e RPE, determinou-se que os ferros se encontram acoplados antiferromagneticamente fazendo com que o centro possua um $S = 0$.

O outro estado de oxidação possível para este centro é o estado de valência mista, ou seja no qual o centro possui um átomo de ferro ferroso e outro férrico. Neste estado a proteína está activa e possui uma cor rosada (forma "Pink"). O espectro de UV-visível apresenta agora um máximo entre os 505 e os 515 nm. O espectro de RPE contém ressonâncias com $g < 2$, características de um centro binuclear de ferro contendo um ligando μ -oxo (ver tabela III.6)^{49,50}. O espectro de Mössbauer adquirido a 185 K apresenta dois doubletos de quadrupolo, um deles com parâmetros típicos de ferro ferroso e outro de ferro

férrico, de alto spin. Por sua vez o espectro adquirido a 4.2 K e 35 mT, apresenta uma espécie magnética⁴⁹. Todas estas observações levam a pensar que estamos na presença de um acoplamento antiferromagnético, resultando num estado de spin com $S = 1/2$.

Na ausência de dados provenientes da cristalografia de raios-X, foi proposta a estrutura da figura III.8 como modelo para a coordenação deste centro binuclear⁴³. Esta proposta tem por base as diversas técnicas espectroscópicas até agora utilizadas no estudo das PAP (NMR, Ressonância de Raman, EXAFS, Mössbauer, RPE e susceptibilidade magnética).

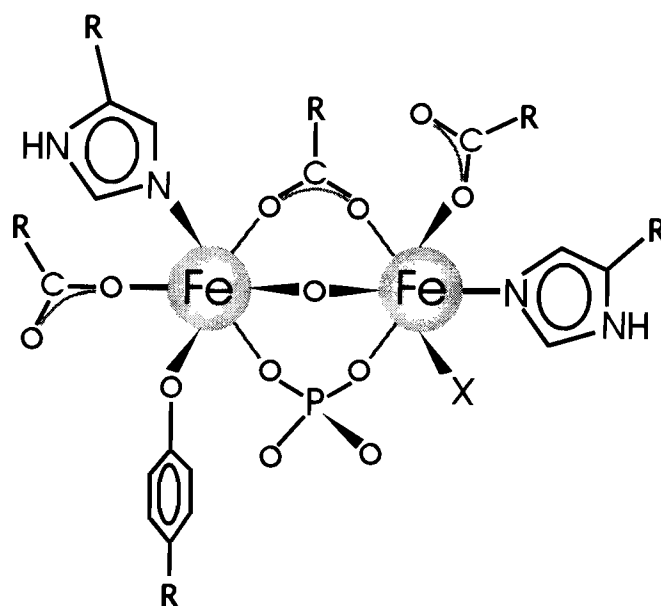


Figura III.7 - Modelo proposto por Vincent e colaboradores para a coordenação do centro binuclear presente nas fosfatases ácidas púrpura (adaptado de 43).

Tabela III.5

Determinação do conteúdo em ferro de diversas proteínas contendo centros binucleares μ -oxo.

Proteína	Ano	Conteúdo em ferro	Método de determinação da proteína	Método de determinação do ferro	Referência
Fosfatase ácida	1973	1.0	A ₂₈₀	Colorimétrico	45
púrpura	1978	2.0	—	—	47
(Baço de boi)	1981	2.1 \pm 0.1	Lowry	E.E.P. [⊛]	51
	1982	2 \pm 0.1	A ₂₈₀	Colorimétrico e E.E.P.	52
Uteroferrina	1974	1.0 \pm 0.1	—	Colorimétrico e E.E.P.	46
	1980	2 \pm 0.2	A ₂₈₀	E.A.A. [⊞]	48
	1982	1.18	A ₂₈₀	Colorimétrico e E.A.A.	53
	1983	1.8	A ₂₈₀	Colorimétrico	50
Redutase de	1973	2	A ₂₈₀	Colorimétrico	18
Ribonucleotídeos,	1979	2.2	A ₂₈₀ e Lowry	Colorimétrico	17
subunidade B2 (<i>E. coli</i>)	1989	3.8	A ₂₈₀	Colorimétrico e E.E.P.	19
Mono-oxigenase do Metano, hidroxilase					
<i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath),	1983	2.3 \pm 0.1	BioRad	Colorimétrico	30
<i>Methylobacterium sp.</i> CRL-26	1987	2.8 \pm 0.1	—	Colorimétrico e E.E.P.	26
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	1988	4.3	Bradford	Colorimétrico e E.E.P.	25

⊛ E.E.P. - Espectroscopia de Emissão de Plasma.

⊞ E.A.A. - Espectroscopia de Absorção Atômica.

Tabela III.6

Máximos de absorvância no espectro de UV-visível de diversas proteínas contendo centros binucleares μ -oxo.

Proteína	Máximos de absorvância (nm) (Coeficiente de extinção molar, $M^{-1}cm^{-1}$)	Referência
<i>Hemeritrina</i>		
Oxi-hemeritrina	330 (6800), 360 [*] (5450), 500 (2200), 750 [*] (200)	17
Met-hydroxohemeritrina	320 (6800), 362 (5900), 480 (550), 597 (160)	17
Met-aquohemeritrina	355 (6400), 480 (600), 580 (200)	17
Met-clorohemeritrina	329 (6600), 380 (6000), 490 (750), 656 (180)	17
Deoxi-hemeritrinaNO	408 (1200), 500 [*] (700), 600 (500)	10
Deoxi-hemeritrinaFNO	340 [*] (2700), 450 (1200), 590 (750)	10
Met-hemeritrinaS ²⁻	464 (4500), 516 [*] , 540 [*] (3300), 680 [*] (1200)	11
Semi-MethemeritrinaS ²⁻	340 [*] , 500	11
<i>Redutase de Ribonucleotídeos</i>		
Subunidade B2	325 (10000), 370 (8700), 390 (7200), 410 (6600), \approx 500 (900), 600 (500)	17
Subunidade B2 reagida com hidroxíurea	325 (9400), 370 (7200), \approx 500 (800), 600 (300)	17
<i>Mono-oxigenase do metano</i>		
<i>Hidroxilase de</i> <i>M. capsulatus</i> (Bath)	408	26
<i>Hidroxilase de</i> <i>Methylobacterium</i> sp. CRL-26	282	25
<i>Hidroxilase de</i> <i>M. trichosporium</i> OB3b	280-290, 406-410 [*] , [*]	30

Tabela III.6 (continuação)

Máximos de absorvância no espectro de UV-visível de diversas proteínas contendo centros binucleares μ -oxo.

Proteína	Máximos de absorvância (nm) (Coeficiente de extinção molar, $M^{-1}cm^{-1}$)	Referência
<i>Fosfatases ácidas púrpuras</i>		
oxidada	545-550	43
reduzida	505-515	43
Uteroferrina oxidada	550 (2000)	43, 54
Uteroferrina reduzida	510	51, 48

* Banda larga.

* Presente apenas em algumas preparações.

Tabela III.7

Valores de g obtidos por RPE para diferentes estados de oxidação de diversas proteínas contendo centros binucleares μ -oxo.

Proteína	Valores de g	Organismo	Referência
<i>Hemeritrina</i>			
(Semimet) _R	1.96, 1.88, 1.67	<i>Themiste zostericola</i>	9
(Semimet) _O	1.95, 1.72, 1.68	<i>Themiste zostericola</i>	9
Azidomet-Hemeritrina	1.94, 1.85, 1.57	<i>Themiste zostericola</i>	9
Semimet-hemeritrinaS ²⁻	1.88, 1.71, 1.40	<i>Pascolopsis gouldii</i>	11
DeoxyhemeritrinaNO	2.77, 1.84	<i>Pascolopsis gouldii</i>	10
DeoxyhemeritrinaFNO	2.58, 1.80	<i>Pascolopsis gouldii</i>	10
<i>Redutase de Ribonucleotídeos</i>			
Subunidade B2	2.0047	<i>E. coli</i>	18
Subunidade B2 (reduzida com ditionito de sódio)	Ressonância a campo baixo	<i>E. coli</i>	19
Semi-reduzida	1.93, 1.85, 1.64	<i>E. coli</i>	4
<i>Mono-oxigenase do Metano</i>			
Hidroxilase	4.3, 2.01	<i>M. trichosporium</i> OB3b <i>M. capsulatus</i> (Bath)	25, 30, 55
Semi-Reduzida	1.94, 1.86, 1.75 1.92, 1.86, 1.71	<i>M. trichosporium</i> OB3b <i>M. capsulatus</i> (Bath)	25,33,55
Reduzida	15	<i>M. trichosporium</i> OB3b <i>M. capsulatus</i> (Bath)	35,55
<i>Fosfatase ácida púrpura</i>			
Forma "Pink"	1.92, 1.77, 1.63	Baço de boi	52
Forma "Pink"	1.93, 1.74, 1.59	Uteroferrina	50,49

Tabela III.8

Parâmetros obtidos da Espectroscopia de Mössbauer para diferentes estados de oxidação de diversas proteínas contendo centros binucleares μ -oxo.

Proteína	T (K)	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	Organismo	Referência
<i>Hemeritrina</i>					
Oxi-hemeritrina	77	1.92	0.52	<i>Pascolopsis gouldii</i>	7, 56
		1.00	0.48		
	4.2	1.92	0.54	<i>Pascolopsis gouldii</i>	7
		1.09	0.51		
Deoxi-hemeritrina	195	2.75	1.11	<i>Pascolopsis gouldii</i>	7
	77	2.81	1.19	<i>Pascolopsis gouldii</i>	7,56
	4.2	2.89	1.20	<i>Pascolopsis gouldii</i>	7,56
	4.2	2.83*	1.19*	<i>Pascolopsis gouldii</i>	56
Deoxi-hemeritrinaNO	100	0.61	0.68	<i>Pascolopsis gouldii</i>	10
		2.65	1.21		
Deoxi-hemeritrinaFNO	100	1.02	0.75	<i>Pascolopsis gouldii</i>	10
		3.09	1.22		
Azidomet-hemeritrina	77	1.91	0.50	<i>Pascolopsis gouldii</i>	56
Met-clorohemeritrina	77	2.04	0.50	<i>Pascolopsis gouldii</i>	56
	4.2	2.12	0.59	<i>Pascolopsis gouldii</i>	56
Tiocianato met-hemeritrina	77	1.92	0.55	<i>Pascolopsis gouldii</i>	56

Tabela III.8 (continuação)

Parâmetros obtidos da Espectroscopia de Mössbauer para diferentes estados de oxidação de diversas proteínas contendo centros binucleares μ -oxo.

Proteína	T (K)	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	Organismo	Referência
Tiocianato met-hemeritrina	4.2	1.90	0.48	<i>Pascolopsis gouldii</i>	56
Semimet-hemeritrinaS ²⁻	100	1.58 2.43	0.58 1.14	<i>Pascolopsis gouldii</i>	11
Met-hemeritrinaS ²⁻	100	0.99 ⁺	0.50 ⁺	<i>Pascolopsis gouldii</i>	11
<i>Redutase de Ribonucleotídeos</i>					
Subunidade B2	4.2	1.62 2.44	0.55 0.45	<i>E. coli</i>	19
Subunidade B2	187	2.91	1.19	<i>E. coli</i>	19
reduzida	4.2	3.13	1.26	<i>E. coli</i>	19
<i>Mono-oxigenase do Metano</i>					
Hidroxilase	80	1.05	0.50	<i>M. capsulatus</i> (Bath)	55
	4.2	1.07	0.50	<i>M. trichosporium</i> OB3b	33
Hidroxilase	80	3.01	1.30	<i>M. capsulatus</i> (Bath)	55
reduzida	153	3.07 $\approx 1.9^*$	1.26 $\approx 1.26^*$	<i>M. trichosporium</i> OB3b	33
	103	3.12 $\approx 2.1^*$	1.26 $\approx 1.3^*$	<i>M. trichosporium</i> OB3b	33
	4.2	3.14 $\approx 2.4^*$	1.30 $\approx 1.3^*$	<i>M. trichosporium</i> OB3b	33
Composto Q	4.2	0.53	0.17	<i>M. trichosporium</i> OB3b	36

Tabela III.8 (continuação)

Parâmetros obtidos da Espectroscopia de Mössbauer para diferentes estados de oxidação de diversas proteínas contendo centros binucleares μ -oxo.

Proteína	T (K)	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	Organismo	Referência
<i>Fosfatase ácida púrpura</i>					
Forma "Purple" (Fe ³⁺ , Fe ³⁺)	10	1.65	0.55	Uteroferrina	49
		2.12	0.46		
Forma "Pink" (Fe ³⁺ , Fe ²⁺)	185	1.81	0.48	Uteroferrina	49
		2.58	1.18		
	100	1.83	0.52		
		2.60	1.22		
	60	1.84	0.53		
		2.68	1.24		

- * Na presença de um campo magnético aplicado de 5 kG.
- † Na presença de um campo magnético aplicado de 1.7 kG.
- * Componente minoritária (aproximadamente 30%).

III.6. Bibliografia.

1. Klippenstein, G.L., Van Riper, D.A., e Oosterom, E.A. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 5959-5963.
2. Stenkamp, R.E., Sieker, L.C., e Jensen, L.H. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 618-622.
3. Clark, P.E., e Webb, J. (1981) *Biochemistry* **20**, 4628-4632.
4. Howard, J.B., e Rees, D.C. (1991) *Advances in Protein Chemistry* **42**, 199-280.
5. Maroney, M.J., , Nocek, J.M, Pearce, L.L., e Que, L., Jr. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 6871-6879.
6. Sheriff, S., Hendrickson, W.A., e Smith, J.L. (1987), *J. Mol. Biol.* **197**, 273-296.
7. Okamura, M.Y., Klotz, I.M., Johnson, C.E., Winter, M.R.C., e Williams, R.J.P. (1969) *Biochemistry* **8**, 1951-1958.
8. Holmes, M.A., Le Trong, I., Turley, S., Sieker, L.C. e Stenkamp, R.E. (1991) *J. Mol. Biol.* **218**, 583-593.
9. Muhoberac, B.B., Wharton, D.C., Babcock, L.M., Harrington, P.C., e Wilkins, R.G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **626**, 337.
10. Nocek, J.M, Kurtz, D.M., Jr., Sage, J.T., Xia, Y.-M., Debrunner, P., Shiemke, A.K., Sanders-Loher, J., Loher, T.M. (1988) *Biochemistry* **27**, 1014-1024.
11. Lukat, G.S., Kurtz, D.M., Jr., Shiemke, A.K., Loehr, T.M., e Sanders-Loehr, J. (1984) *Biochemistry* **23**, 6416-6422.
12. Zhang, J.-H., Kurtz, D.M., Jr., Xia, Y.-M., e Debrunner, P.G. (1991) *Biochemistry* **30**, 583-589.
13. Reichard, P., e Ehrenberg, A. (1983) *Science* **221**, 514-519.
14. Stubbe, J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5329-5332.
15. Reichard, P. (1993) *Science* **260**, 1773-1777.
16. Sjöberg, B.-M., Reichard, P., Gräslund, A., Ehrenberg, A. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 6863-6865.

17. Petersson, L., Gräslund, A., Ehrenberg, A., Sjöberg, B.-M., Reichard, P. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 6706-6712.
18. Atkin, C.L., Thelander, L., Reichard, P., e Lang, G. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 7464-7472.
19. Lynch, J.B., Juarez-Garcia, C., Münk, E., e Que, L., Jr. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 8091-8096.
20. Eliasson, R., Pontis, E., Fontecave, M., Gerez, C., Harder, J., Jörnvall, H., Krook, M., e Reichard, P. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 25541-25547.
21. Eliasson, R., Fontecave, M., Jörnvall, H., Krook, M., Pontis, E., e Reichard, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3314-3318.
22. Nordlund, P., Sjöberg, B.-M., Eklund, H. (1990) *Nature* **345**, 593-598.
23. Colby, J., Stirling, D.I., e Dalton, H. (1977) *Biochem. J.* **165**, 395-402.
24. Liu, K.E., Johnson, C.C., Newcomb, M., e Lippard, S.J. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 939-947.
25. Fox, B.G., Froland, W.A., Dege, J.E., e Lipscomb, J.D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10023-10033.
26. Patel, R.N., e Savas, J.C. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 2313-2317.
27. Patel, R.N. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **252**, 229-236.
28. Colby, J., e Dalton, H. (1978) *Biochem. J.* **171**, 461-468.
29. Green, J., e Dalton, H. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 15795-15801.
30. Woodland, M.P., e Dalton, H. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 53-59.
31. Prior, S.D. e Dalton, H. (1985) *FEMS Microbiol. Lett.* **29**, 105-109.
32. Woodland P.M., Patil, D.S., Cammack, R., e Dalton, H. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **873**, 237-242.
33. Fox, B.G., Surerus, K.K., Münk, E., e Lipscomb, J.D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 10553-10556.

34. Liu, K.E., e Lippard, S.J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 12836-12839.
35. Hendrich, M.P., Münk, E., Fox, B.G., e Lipscomb, J.D. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 5861-5865.
36. Lee, S.-K., Fox, B.G., J.C., Froland, W.A., Lipscomb, J.D., e Münk, E. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6450-6451.
37. Lee, S.-K., Fox, B.G., Nesheim, J.C., Froland, W.A., Münk, E., e Lipscomb, J.D. (1993) *J. Inorg. Biochem.* **51**, 243.
38. Paulsen, K.E., Liu, Y., Fox, B.G., Stankovich, M.T., Lipscomb, J.D., e Münk, E. (1993) *J. Inorg. Biochem.* **51**, 307.
39. J.G., Rosenzeig, Frederick, C.A., e Lippard, S.J. (1992) *J. Mol. Biol.* **227**, 583-585.
40. Nordlund, P., Dalton, H., e Eklund, H. (1992) *FEBS Lett.* **307**, 257-262.
41. Andersson, K.K., Elgren, T.E., Fox, B.G., Hendrich, M.P., Froland, W.A., Münk, E., Que, L., Jr., e Lipscomb, J.D. (1993) *J. Inorg. Biochem.* **51**, 299.
42. DeRose, V.J., Liu, K.E., Kurtz, D.M., Jr., Lippard, S.J., e Hoffman, B.M. (1993) *J. Inorg. Biochem.* **51**, 495.
43. Vincent, J.B., Averill, B.A. (1990) *FASEB J.* **4**, 3009-3014.
44. Nuttleman, P.R., Roberts, R.M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12192-12199.
45. Campbell, H.D., e Zerner, B. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 1498-1503.
46. Schlosnagle, D.C., Bazer, F.W., Tsibris, J.C.M., e Roberts, R.M. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 7574-7579.
47. Campbell, H.D., e Zerner, B. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 1498-1503.
48. Keough, D.T., Dionysius, D.A., Jersey, J., e Zerner, B. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **94**, 600-605.

49. Debrunner, P.G., Hendrich, M.P., Jersey, J., Keough, D.T., Sage, J.T., e Zerner, B. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **745**, 103-106.
50. Antanaitis, B.C., Aisen, P., e Lilienthal, H.R. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 3166-3172.
51. Davis, J.C., Lin, S.S., e Averill, B.A. (1981) *Biochemistry* **20**, 4062-4067.
52. Davis, J.C., e Averill, B.A. (198) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4623-4627.
53. Buhi, W.C., Gray, W.J., Mansfield, E.A., Chun, P.W., Ducsay, C.A., Bazer, F.W., e Roberts, R.M. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **701**, 32-38.
54. Chen, T.T., Bazer, F.W., Cetorelli, J.J., Pollard, W.E., e Roberts, R.M. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 8560-8566.
55. DeWitt, J.G., Bentsen, J.G., Rosenzeig, A.C., Hedman, B., Green, J., Pilkington, S., Papaefthymiou, G.C., Dalton, H., Hodgson, K.O., e Lippard, S.J. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9219-9235.
56. Garbet, K., Johnson, C.E., Klotz, I.M., Okamura, M.Y., e Williams, R.J.P. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **142**, 574-583.

Capítulo IV.

A DESULFOREDOXINA SINTÉTICA.

IV. Desulforedoxina Sintética	103
1. Introdução	105
2. Síntese da cadeia polipeptídica.	105
3. Reconstituição do centro metálico.	105
4. Composição e sequência de ácidos aminados.	107
5. Determinação do conteúdo em ferro.	107
6. Espectroscopia de UV-Visível.	111
7. Espectroscopia de RPE	111
8. Espectroscopia de Mössbauer.	112
9. Discussão.	116
10. Bibliografia	119

IV.1. Introdução

No capítulo II foi descrita a desulforedoxina, uma metaloproteína purificada de *D. gigas*. Trata-se de uma das proteínas de ferro-enzofre mais simples, pois o seu centro metálico é apenas constituído por um átomo de ferro ligado a quatro enzofres numa esfera de coordenação aproximadamente tetraédrica. É em parte esta simplicidade que permite que se possa reconstituir este centro a partir da apoproteína com um rendimento de aproximadamente 90%.¹

Mas não é só a constituição do grupo prostético que faz da desulforedoxina uma proteína simples. A desulforedoxina é uma proteína de baixa massa molecular que se apresenta na forma dimérica. Cada monómero é constituído apenas por 36 ácidos aminados. Este facto permite que a totalidade da cadeia possa ser sintetizada por meios exclusivamente químicos.

Neste capítulo apresenta-se o resultado da tentativa de síntese e reconstituição da desulforedoxina.

IV.2. Síntese da cadeia polipeptídica.

A síntese da cadeia polipeptídica foi efectuada num sintetizador de polipeptídeos (Advanced Chemtech MPS350), utilizando o método químico FMOC de acordo com os protocolos de síntese dos fabricantes. O polipeptídeo foi desprotegido através da reacção com TFA/fenol, etanodiol e tioanisole. Após liofilização, o polipeptídeo foi analisado por HPLC de fase reversa (Applied Biosystems 130A) e por análise de ácidos aminados (Applied Biosystems 420A).

IV.3. Reconstituição do centro metálico.

A reconstituição da desulforedoxina sintética foi efectuada de modo semelhante ao anteriormente descrito por Moura *et. al.*¹. Um total de 62.7 mg do material proveniente da síntese química foi dissolvido em 3 ml de tampão Tris-HCl 50 mM e posteriormente

precipitado por adição de TCA (à concentração final de 5%) na presença de 0.5 M de β -mercaptoetanol. Após centrifugação, o precipitado foi dissolvido em 4 ml de Tris Base 0.5 M contendo β -mercaptoetanol 60 mM. A quantidade de proteína em solução foi então estimada pela absorção a 279 nm ($\epsilon_{279} = 5535 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), obtendo-se o valor aproximado de 13 mg. Neste passo a solução não possuía uma absorção significativa a comprimentos de onda superiores aos 400 nm (ver secção de UV-visível).

A solução obtida foi mantida durante 30 minutos sob argon. Procedeu-se então à adição de 30 μl de uma solução de ^{57}Fe com a concentração de 221 mM (excesso de duas vezes em relação à proteína estimada). Deixou-se a solução a incubar durante 15 minutos, após os quais se expôs a solução ao ar. A solução final apresentava uma coloração rosa escura, prova de que a reconstituição dos centros tinha sido efectuada. O espectro de visível revelava já a presença de um centro do tipo Dx, com picos característicos a 495 e a 368 nm.

Procedeu-se de seguida a dois passos de purificação da desulforedoxina sintética obtida. O primeiro consistiu na aplicação da solução num sistema de HPLC equipado com uma coluna de filtração em gel Superdex G75 (Pharmacia). Foi utilizado como fase móvel o tampão Tris-HCl 0.3 M / NaCl 0.1 M a pH 7.0, com um caudal de 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. Conseguiu-se assim separar o excesso de reagentes (compostos de baixo peso molecular) bem como um produto da reacção de maior peso molecular.

Devido à reconstituição ter sido feita usando uma quantidade excedentária de ferro, é normal que existam átomos de ferro adventiciamente ligados à proteína. Na tentativa de resolver este problema aplicou-se a proteína numa coluna (20 x 1.5 cm) com um enchimento de DEAE Biogel (BioRad), equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM a pH 7.6. A proteína adsorvida foi então lavada com 50 ml de Tris-HCl 10 mM e eluída com um gradiente descontínuo de 50 ml do referido tampão às seguintes forças iónicas: 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mM. A fracção de proteína eluída entre 200 e 250 mM apresentava uma razão UV-visível semelhante à obtida para a proteína purificada a partir de *D. gigas* ($A_{507/280}=1.33$). Finalmente, a fracção obtida foi concentrada num diaflo (Amicon) equipado com uma membrana YM3, sendo diminuída a força iónica por sucessivas adições de água bidestilada. A

quantificação da proteína reconstituída foi feita através da utilização da absorvância medida a 507 nm ($\epsilon_{507} = 4580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), tendo-se obtido o valor de 9 mg (correspondente a um rendimento de 70%).

IV.4. Composição e sequência de ácidos aminados.

Como medida de controle, foi determinada a composição e a sequência de ácidos aminados. A composição de ácidos aminados foi efectuada segundo o método da hidrólise ácida (ver apêndice A - Métodos). Para a determinação da sequência foi utilizado um sequenciador automático (Applied Biosystems 477A) baseado na degradação de Edman. Os resultados são apresentados na tabela IV.1 e na figura IV.1, respectivamente. Como esperado, ambas as determinações revelam que a estrutura primária da proteína sintética é idêntica à da proteína nativa.

1				5					10
Ala	Asn	Glu	Gli	Asp	Val	Tir	Lis	Cis	Glu
11				15					20
Leu	Cys	Gli	Gln	Val	Val	Lis	Val	Leu	Glu
21				25					30
Glu	Gli	Gli	Gli	Tre	Leu	Val	Cis	Cis	Gli
31				35					
Glu	Asp	Met	Val	Lis	Gln				

Figura IV.1 - Sequência de ácidos aminados da proteína sintética.

IV.5. Determinação do conteúdo em ferro.

A quantidade total de ferro foi determinada pela formação de um complexo ferroso com o 2,4,6-tripiridil-s-triazina tal como descrito por Fischer e Price² (ver apêndice A - Métodos). A quantificação da proteína foi efectuada por dois métodos alternativos. Assim a

determinação foi feita por análise de ácidos aminados e pelo método descrito por Lowry³ (ver apêndice A - Métodos). Obteve-se o valor de 0.8 ± 0.3 átomos de ferro por cadeia polipeptídica. Este valor está de acordo com o facto de existir um centro do tipo Dx por molécula e revela também que não deverá existir ferro adventício na proteína sintética.

Tabela IV.1

Composição de ácidos aminados da Desulforedoxina sintética.

Ácido aminado	Análise de ácidos aminados	Sequência
Asp + Asn	3	3
Tre	1	1
Glu + Gln	8	7
Gli	7	6
Ala	1	1
Cis	4	4
Val	6	6
Met	1	1
Leu	3	3
Tir	1	1
Lis	3	3
Total de ácidos aminados	38	36
Massa molecular (Da)	4656.19	4433.98

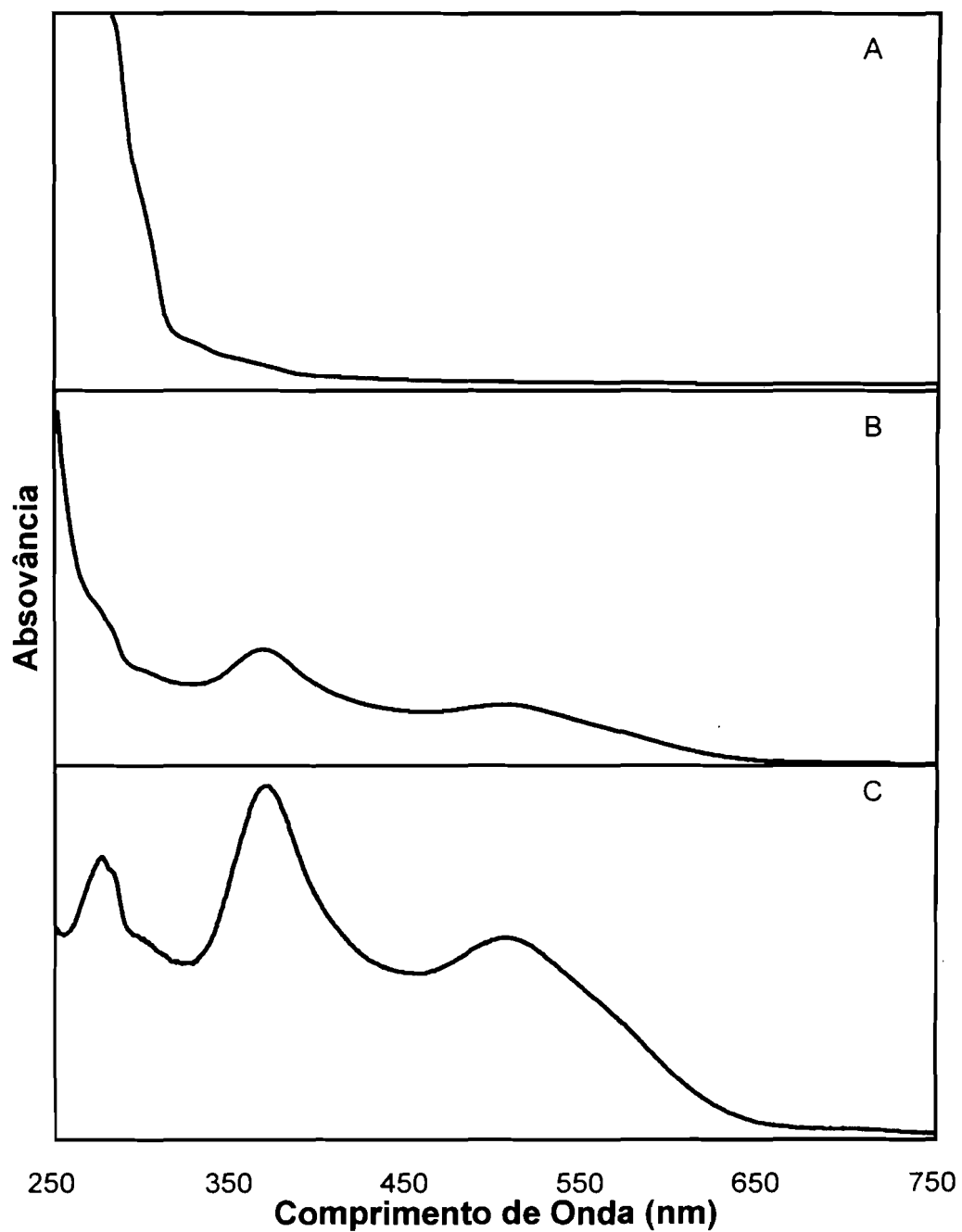


Figura IV.2 - Espectros de UV-visível obtidos em diversas fases da reconstituição: (A) após dissolução do polipeptídeo; (B) após incubação com ^{57}Fe e (C) após as duas etapas de purificação descritas.

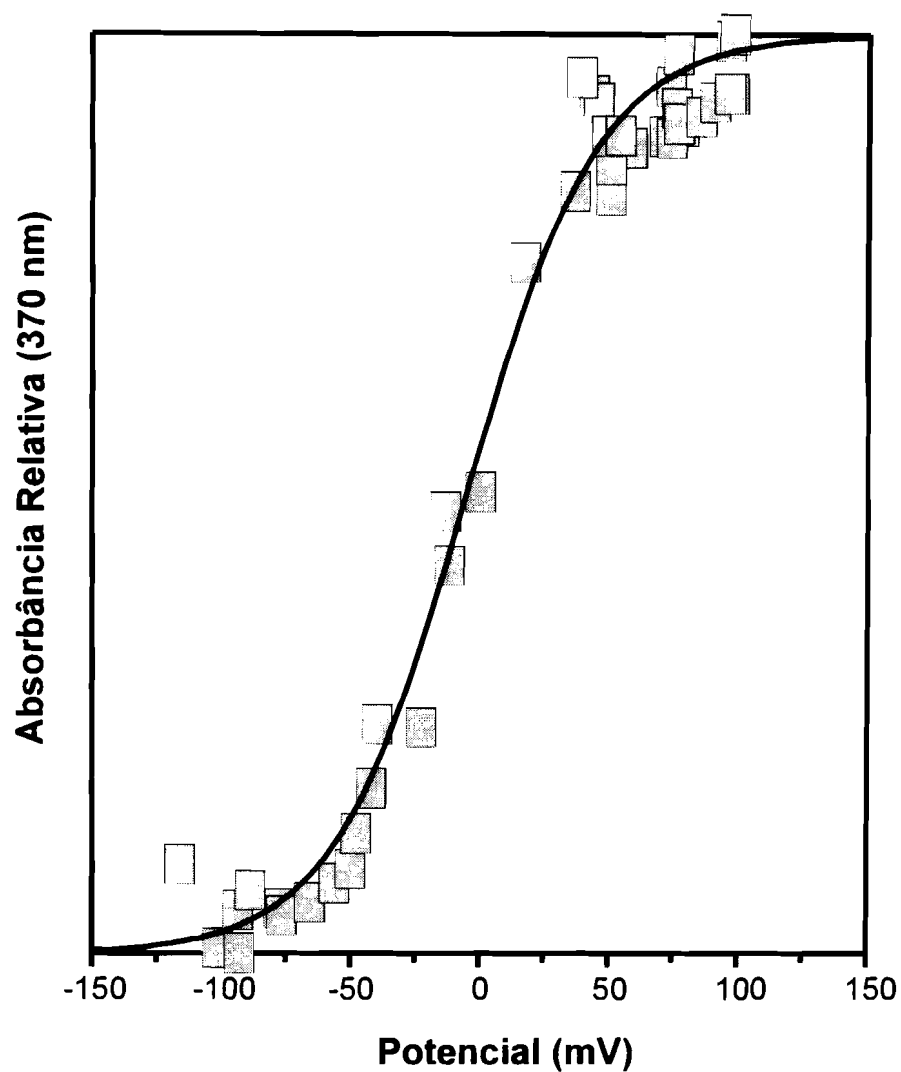


Figura IV.3 - Curva obtida para a titulação potenciométrica da desulforedoxina sintética. A variação da absorvância foi seguida a 368 nm. A linha a cheio representa a simulação da curva usando a equação descrita no texto, com $E_0 = +5$ mV.

IV.6. Espectroscopia de UV-Visível.

O espectro do peptídeo sintético antes da reconstituição não apresenta absorção significativa acima dos 350 nm (ver figura IV.2a). Após a incubação com ^{57}Fe e posterior oxidação ao ar, o espectro apresenta já a forma característica do espectro de visível dos centros do tipo Dx, com máximos a 368 e 507 nm (ver figura IV.2b). Após os dois passos de purificação atrás descritos o espectro da proteína sintética é claramente semelhante ao da proteína nativa (ver figura IV.2c), com máximos a 277 ($\epsilon_{277} = 6150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 368 ($\epsilon_{368} = 7630 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 507 nm ($\epsilon_{507} = 4420 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Para se proceder à determinação do potencial de oxidação-redução do centro foi efectuada uma titulação potenciométrica por visível (ver apêndice A - Métodos). Na figura IV.3 está representada a absorvância relativa (medida a 368 nm) em função do potencial da solução. A linha sólida foi obtida usando uma equação de Nernst:

$$E = E_0 + \frac{59}{n} \log \left\{ \frac{[DxSin(ox)]}{[DxSin(red)]} \right\}$$

Sendo E_0 o potencial de meia onda do centro do tipo Dx e n o número de electrões envolvidos no processo. A simulação foi obtida para $E_0 = +5 \pm 15 \text{ mV}$ e $n = 1$.

IV.7. Espectroscopia de RPE.

Na figura IV.4 está representado o espectro de RPE. da proteína sintética, adquirido a 4.2 K. O espectro é praticamente idêntico ao observado para a proteína nativa, apresentando ressonâncias a $g = 7.7, 5.8, 4.3$ e 1.87 . Estas ressonâncias podem ser atribuídas a um ião férrico de spin alto ($S = 5/2$) com um valor de E/D igual a 0.08 e D positivo. A dependência de temperatura das ressonâncias a $g = 7.7$ e 5.8 demostram que, tal como na Dx nativa, a primeira possui um comportamento característico de um estado fundamental pertencendo ao dobleto de Kramer com $M_S = \pm 1/2$, enquanto que a segunda provém de um estado excitado

sendo atribuído ao dobleto com $M_S = \pm 3/2$ (para uma discussão mais detalhada do comportamento destes sinais com a temperatura ver capítulo VI).

O espectro de RPE apresenta ainda uma ressonância com pequena intensidade a $g = 9.0$. A presença desta ressonância é comum às proteínas que contêm um centro do tipo Dx ou Rb, como sejam o caso da Dx de *D. gigas*, da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 e da rubredoxina de *D. gigas*. Inicialmente pensou-se que tal ressonância ficava a dever-se à presença de uma impureza contendo ferro. No entanto a presença da ressonância na Dx sintética, bem como em todas as diferentes proteínas citadas, leva a pensar que a ressonância é devida a uma pequena percentagem do centro do tipo Dx que possui uma esfera de coordenação diferente.

IV.8. Espectroscopia de Mössbauer.

O espectro de Mössbauer da proteína sintética, adquirido a 4.2 K na presença de um campo magnético de 950 Gauss aplicado paralelamente à radiação γ , contém uma espécie paramagnética pouco resolvida e um dobleto de quadrupolo (aproximadamente 30 % da absorção total) com os seguintes parâmetros: $\Delta E_Q = 0.80$ mm/s e $\delta = 0.28$ mm/s (ver figura IV.5). O valor obtido para o desvio isomérico indica que o dobleto é originário de uma espécie exclusivamente com enxofres na sua esfera de coordenação. O espectro obtido é bastante semelhante ao obtido para a Dx nativa em amostras de força iónica baixa. O dobleto de quadrupolo é devido aos átomos de ferro com velocidade de relaxação electrónica elevada, possivelmente devido à agregação da proteína. No caso da proteína nativa, foi possível obter apenas um espectro paramagnético na presença de uma força iónica mais elevada (por exemplo 110 mM em NaNO_3). No entanto, no caso da proteína sintética tal não foi possível, mesmo utilizando maiores concentrações salinas.

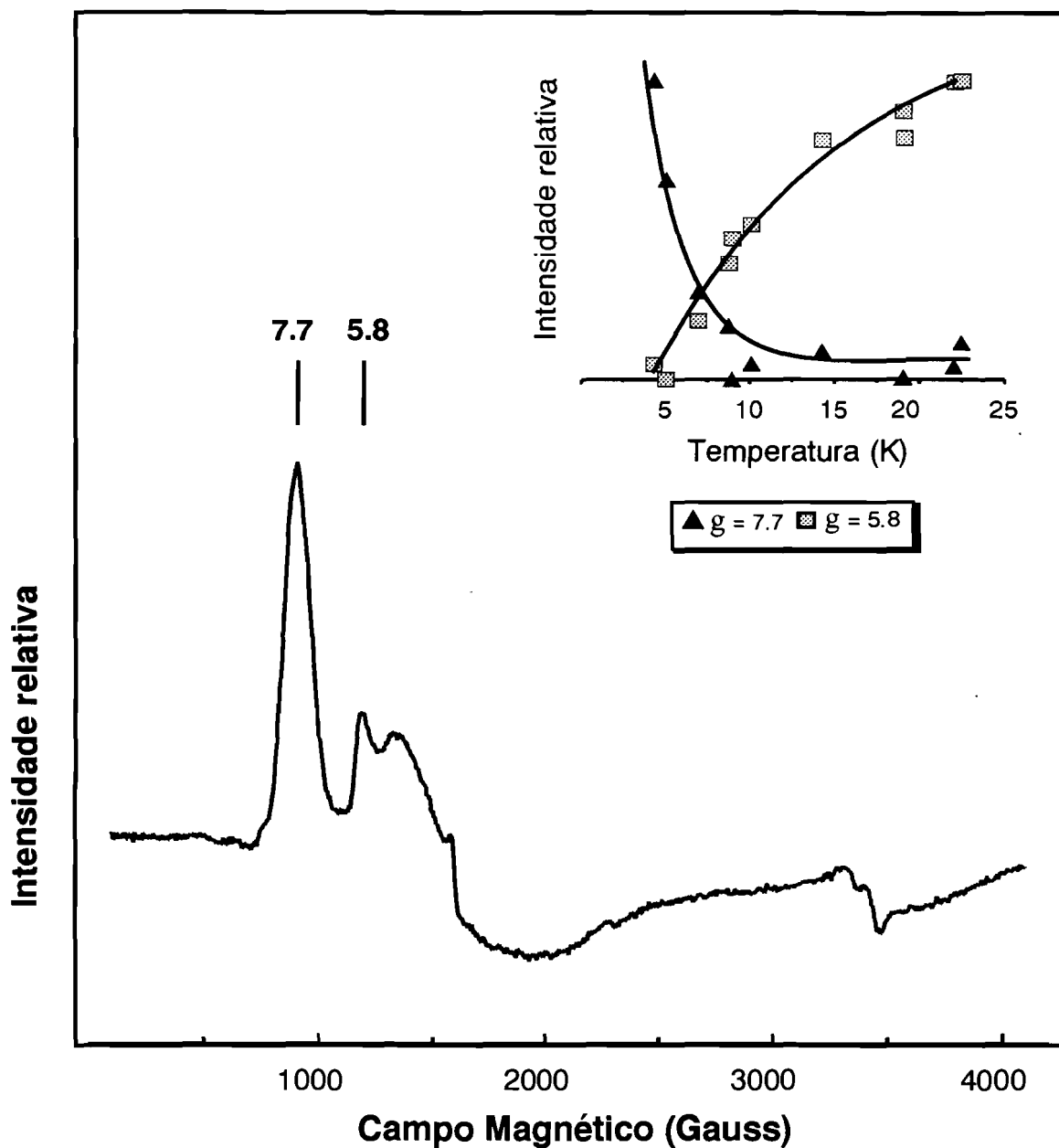


Figura IV.4 - Espectro de RPE da desulforedoxina sintética. Condições experimentais: temperatura 4.3 K; frequência da micro-onda igual a 9.638 GHz; potência da micro-onda igual a 2 mW, amplitude de modulação igual a 0.9 mT e ganho igual a 6.3×10^3 . No canto superior direito apresenta-se a dependência da intensidade das ressonâncias a $g = 7.7$ (\square) e 5.8 (\blacktriangle) com a temperatura.

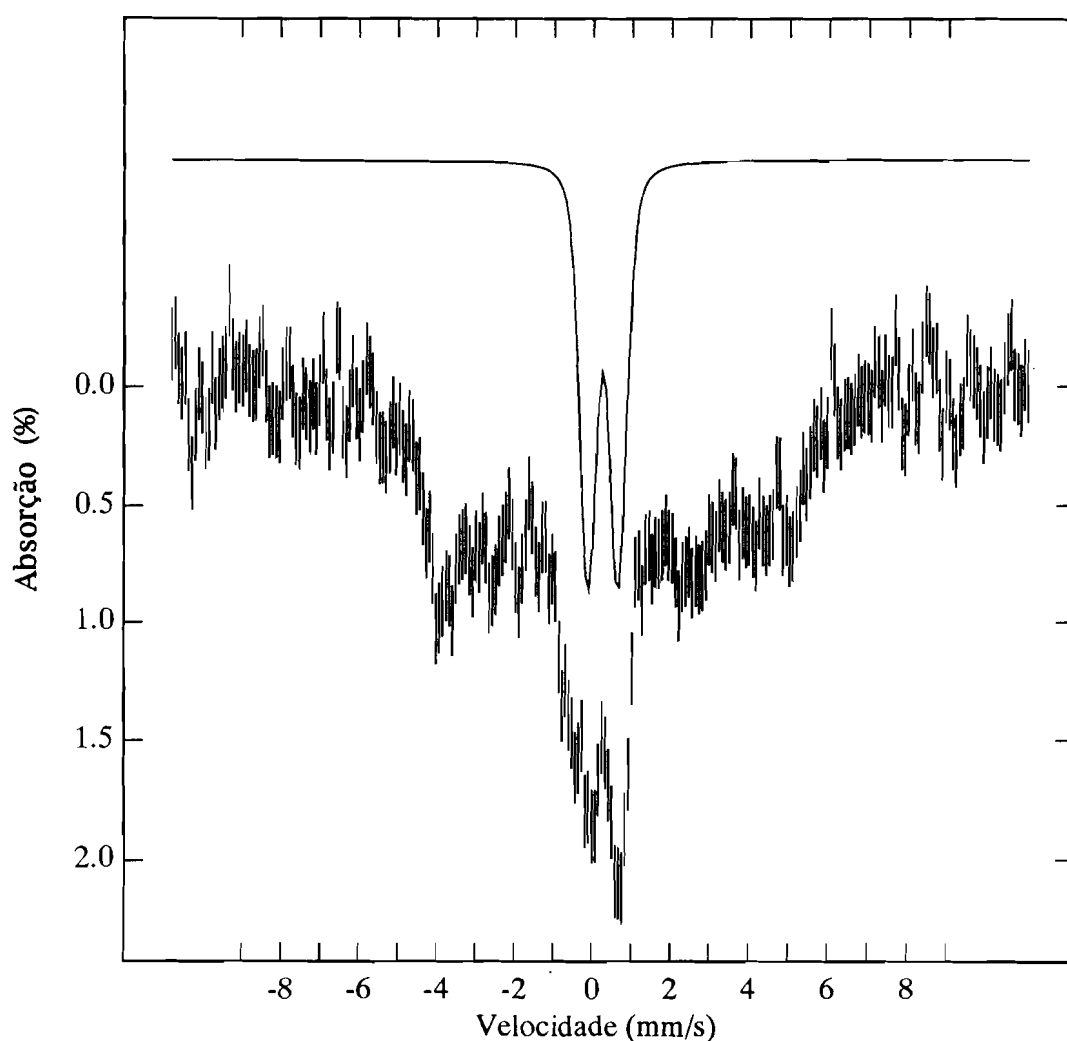


Figura IV.5 - Espectro de Mössbauer da forma nativa (oxidada) da desulforedoxina sintética. O espectro foi adquirido a 4.2 K na presença de um campo magnético, aplicado paralelamente à radiação γ , de 0.95 kG.

A figura IV.6 mostra o espectro obtido após redução da proteína sintética com ditionito de sódio (4.2 K, na ausência de campo magnético aplicado). Aproximadamente 90% da absorvância pode ser atribuída a um dobleto de quadrupolo com os seguintes parâmetros: $\Delta E_Q = 3.60$ mm/s e $\delta = 0.72$ mm/s. Estes parâmetros são extremamente parecidos aos obtidos para a proteína nativa, sendo típicos de sistemas ferrosos com coordenação tetraédrica de ligandos contendo enxofre.

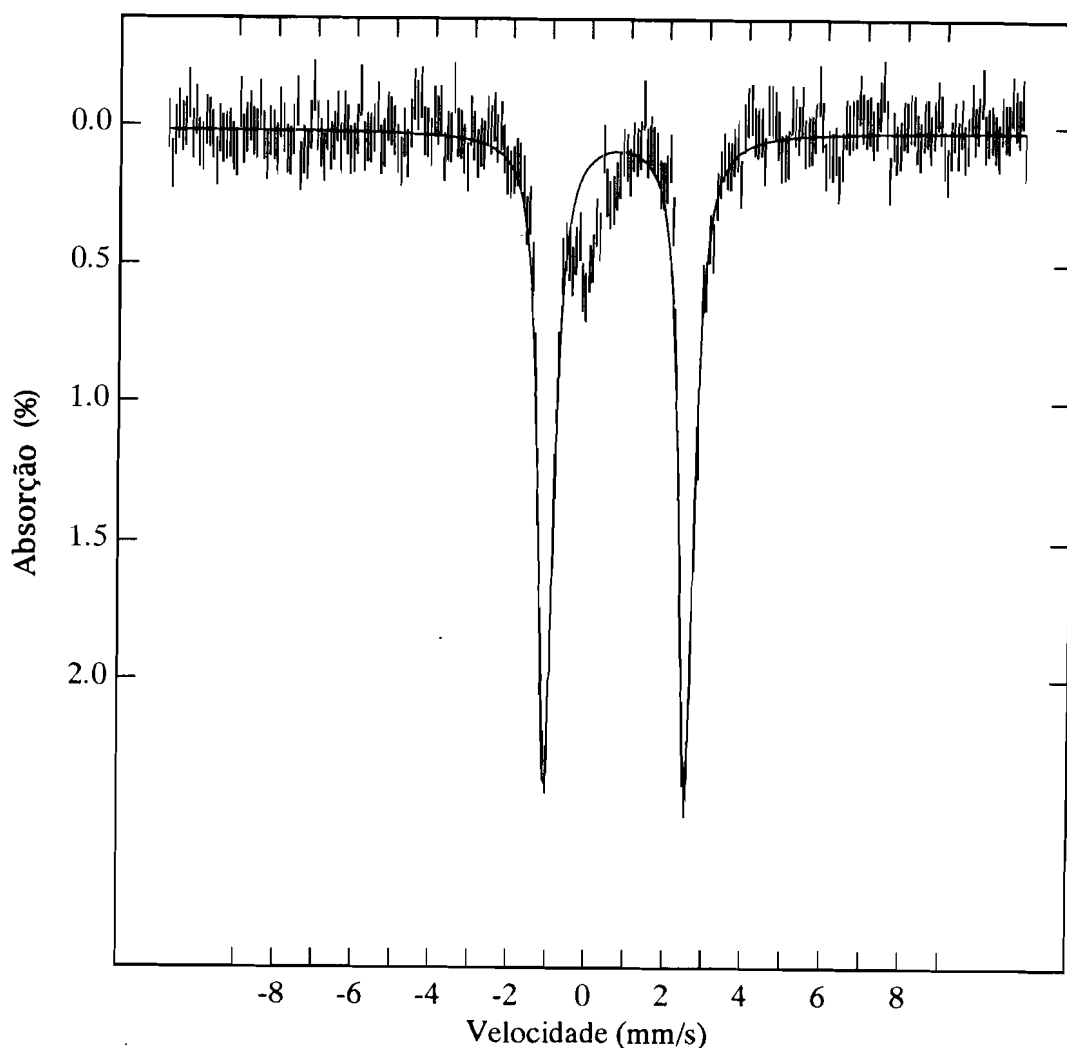


Figura IV.7 - Espectro de Mössbauer da forma reduzida da desulforedoxina sintética. O espectro foi adquirido a 4.2 K na ausência de um campo magnético.

IV.9. Discussão.

A tentativa de síntese da Desulforedoxina pode ser dividida em duas partes. Numa primeira parte foi sintetizada a cadeia polipeptídica de 36 ácidos aminados, recorrendo a uma estratégia de síntese automática de polipeptídeos. Como comprovam os dados de análise e sequência de ácidos aminados, esta síntese permitiu reproduzir a estrutura primária da Dx nativa. Após a obtenção da cadeia polipeptídica foi utilizado um procedimento de reconstituição do centro metálico, bem como da estrutura terciária que o sustenta. As

características bioquímicas e espectroscópicas investigadas para a proteína sintetizada indicam um elevado grau de identidade quando comparada à proteína nativa. A tabela IV.2 compara os resultados obtidos em comparação com os observados para a Dx nativa.

Tabela IV.2

*Características bioquímicas e espectroscópicas da Desulfiredoxina sintética.
Comparação com a proteína isolada de D. gigas.*

		Dx <i>D. gigas</i>	Dx sintética
Conteúdo em ferro	(átomos de ferro por monómero)	1 ± 0.1	0.8 ± 0.3
Potencial de oxidação-redução	(mV)	-35 ± 15	$+5 \pm 15$
Espectroscopia de UV-visível	máximos (ϵ) (nm, $M^{-1}cm^{-1}$)	278 (5630), 370 (7790) and 507 (4580)	277 (6070), 368 (7559) and 507 (4375).
	A_{507}/A_{277}	$r = 1.23$	$r = 1.33$
Espectroscopia de RPE	valores de g	7.7, 5.7, 4.1 and 1.8	7.7, 5.8, 4.3 and 1.87
Espectroscopia de Mössbauer	Parâmetros para a <i>Proteína reduzida</i>	$\Delta E_Q = 3.55$ mm/s e $\delta = 0.70$ mm/s	$\Delta E_Q = 3.60$ mm/s e $\delta = 0.72$ mm/s

Um resultado importante nesta comparação seria o espectro de Mössbauer, da forma oxidada, adquirido na presença de um campo magnético elevado (> 10 kG). Nestas condições, o espectro observado para a proteína isolada de *D. gigas* consiste numa única componente magnética, com parâmetros característicos do centro Dx. Como tal, seria possível comparar parâmetros importantes (p.e. D, A) para a caracterização estrutural do centro na proteína sintética.

Foi, portanto, possível sintetizar completamente uma metaloproteína conhecendo apenas a sua estrutura primária. Ainda que o caso apresentado neste capítulo seja para uma metaloproteína simples, este processo de síntese deixa antever processos pelos quais será possível estudar este tipo de centros de ferro-enxofre. O uso desta mesma cadeia

polipeptídica, sujeita apenas a ligeiras modificações, possibilitará a modelização de centros presentes noutras proteínas. As características desses centros poderão então ser estudadas isoladamente. Um exemplo para esta estratégia são os centros do tipo rubredoxina presentes na rubreritina. Estes centros apresentam um potencial de oxidação-redução bastante superior ao normal (cerca de 200 mV mais elevado do que os centros presentes nas rubredoxinas). Supõe-se que este valor anormal do potencial seja devido aos ácidos aminados vizinhos, mas não coordenados, do ferro. A tentativa de produzir, a partir da estrutura primária da Dx, uma proteína que contenha um centro monomérico semelhante ao existente na rubreritina, poderá permitir estudar estes centros de modo a conhecer a influência da estrutura primária no potencial de oxidação-redução.

IV.10. Bibliografia

1. Moura, I., Huynh, B.H., Hausinger, R.P., LeGall, J., Xavier, A.V., e Münck, E. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2493-2498.
2. Fischer, D.S., e Price, D.C. (1964) *Clin. Chem.* **10**, 21-31.
3. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Capítulo V.

A RUBRERITRINA DE *D. desulfuricans* ATCC 27774.

V. A Rubreritrina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774	119
1. Introdução.	121
2. Purificação.	128
3. Determinação da massa molecular.	131
4. Determinação do conteúdo em ferro.	131
5. Determinação do N-terminal.	132
6. Determinação da composição em ácidos aminados.	133
7. Estudos espectroscópicos.	135
7.1. Espectroscopia de UV-Visível.	135
7.2. Espectroscopia de RPE.	137
7.3. Espectroscopia de Mössbauer.	142
8. Discussão.	151
9. Bibliografia.	152

V.1. Introdução.

A rubreritina foi isolada pela primeira vez em 1988, a partir do extrato celular de *Desulfovibrio vulgaris* estirpe Hildenborough NCIB 8303.¹ Esta proteína é composta por duas subunidades idênticas, de massa molecular igual a 21.9 kDa (determinado por electroforese em gel de poliacrilamida na presença de 1% de SDS). O uso combinado de diversas técnicas espectroscópicas (UV-Visível, RPE e Mössbauer) revelou a existência de dois tipos de centros de ferro. Um dos centros é idêntico ao centro monomérico presente nas rubredoxinas (ver capítulo II), sendo o outro semelhante ao centro binuclear existente na hemeritina (ver capítulo III).

A proteína, purificada aerobicamente, possui um espectro de UV-Visível com máximos de absorção a 492, 365 e 280 nm e picos alargados a 570 e 350 nm. Este espectro de UV-Visível é bastante semelhante ao espectro das rubredoxinas, apresentando no entanto uma maior razão entre a absorção a 365 e a 492 nm. O coeficiente de extinção molar, calculado a 492 nm, tem o valor de $5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (valor calculado por monómero). Na figura V.1 mostra-se a comparação dos espectros de absorção da rubreritina e da rubredoxina de *D. vulgaris*. Por subtração do espectro da rubredoxina ao da rubreritina (normalizando a intensidade a 492 nm) obtém-se o espectro da figura V.1c, que apresenta um máximo a 365 nm ($\epsilon_{365} = 2650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e um pico alargado a 460 nm. Este espectro apresenta algumas semelhanças com o espectro da met-hemeritina que possui um máximo a 355 nm ($\epsilon_{355} = 6400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e picos alargados a 480 e 580 nm.²

O espectro de RPE da rubreritina apresenta ressonâncias a $g = 9.4$ e 4.3 , e um conjunto de ressonâncias com valores de g inferiores a 2. As ressonâncias a $g = 9.4$ e 4.3 são características de um ião férrico de spin alto ($S = 5/2$), sendo idênticas às observadas para as rubredoxinas. As restantes ressonâncias a $g = 1.98$, 1.76 e 1.57 , bem como a forma deste sinal, são semelhantes às observadas para a forma semimet da hemeritina.

O espectro de Mössbauer revelou também a existência de dois tipos de centros distintos. Uma das componentes, cerca de 45% do total da absorção, apresenta um espectro magnético semelhante ao observado para as rubredoxinas na forma oxidada.

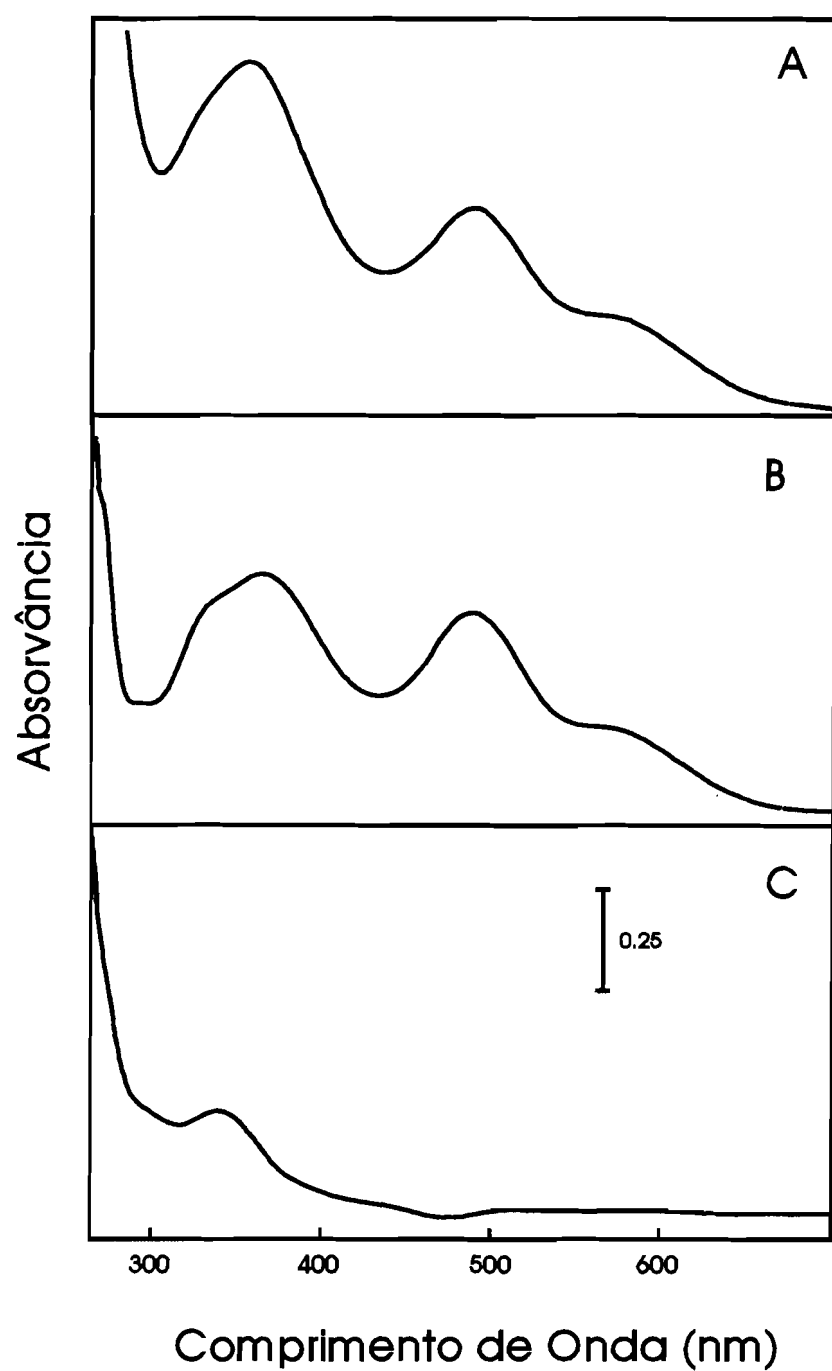


Figura V.1 - Espectros de UV-visível da rubreritrina (A) e da rubredoxina (B) de *D. vulgaris*. O espectro C representa a subtração entre os dois espectros anteriores (A-B), após normalização da intensidade a 490 nm (Adaptado de 1).

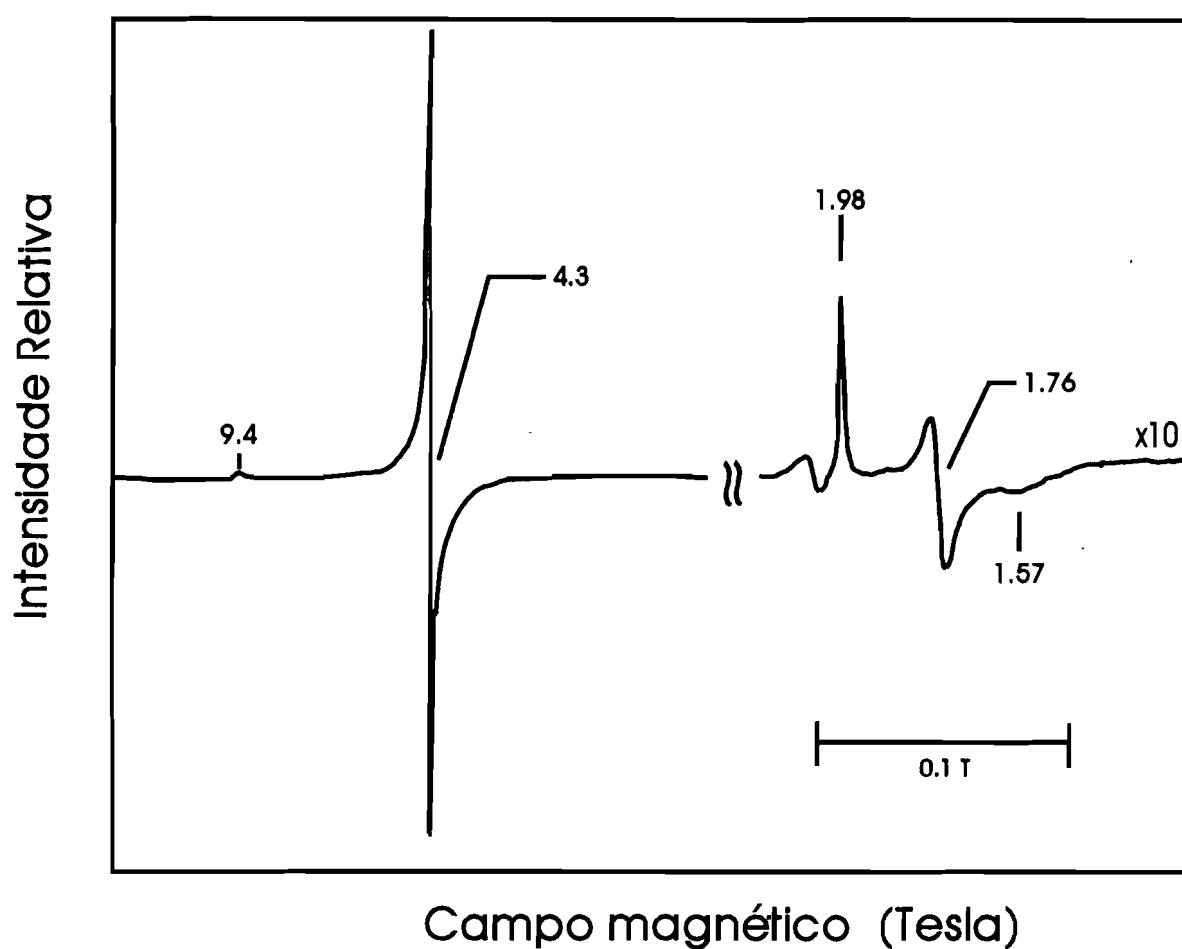


Figura V.2 - Espectro de RPE da rubreritrina de *D. vulgaris*, obtido a 8 K. Outras condições experimentais: frequência da micro-onda igual a 9.435 GHz, potência da micro-onda igual a 2 μ W, amplitude de modulação igual a 1 mT e ganho igual a 5×10^4 (Adaptado de 1).

Aproximadamente 5% do total da absorção pode ser atribuído a um dobleto de quadrupolo com parâmetros semelhantes aos da rubredoxina no estado reduzido ($\Delta E_Q = 3.15$ mm/s e $\delta = 0.70$ mm/s). Este facto deve-se ao potencial de oxidação-redução dos centros do tipo rubredoxina ser bastante elevado, tendo como consequência que uma percentagem destes centros se encontre na forma reduzida.

A outra componente, cerca de 50% do total da absorção, é um dobleto de quadrupolo com os seguintes parâmetros: $\Delta E_Q = 1.47$ mm/s e $\delta = 0.52$ mm/s. Esta última componente apresenta parâmetros típicos de ferro férrico de alto spin. Dados de Mössbauer, adquiridos a diferentes campos magnéticos aplicados, mostraram que os átomos de ferro se encontram num ambiente diamagnético ($S = 0$). Esta observação é explicada pelo facto dos dois átomos de ferro férrico que formam o centro binuclear encontrarem-se acoplados antiferromagneticamente, de modo semelhante ao verificado na hemeritrina.

A quantificação de ferro feita inicialmente para a proteína isolada de *D. vulgaris* revelou a existência de quatro átomos de ferro por dímero. Este facto juntamente com as percentagens de cada tipo de centro, derivadas da espectroscopia de Mössbauer, fizeram com que fosse admitida a existência de dois centros do tipo rubredoxina e um centro binuclear por dímero. No entanto, dados referentes à proteína recentemente isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 (como será discutido mais tarde neste capítulo), dados de RPE³ e dados referentes à reconstituição dos centros na proteína de *D. vulgaris*⁴ provaram a existência de um centro do tipo rubredoxina e de um centro binuclear por monómero.

Foi possível efectuar a reconstituição dos centros presentes na rubreritrina de *D. vulgaris* usando para isso uma metodologia semelhante à anteriormente usada na reconstituição dos centros binucleares da hemeritrina de *Phascolopsis gouldii*.⁵ A proteína reconstituída apresenta características espectrais semelhantes à nativa, existindo no entanto algumas diferenças significativas. Uma dessas diferenças encontra-se no espectro de UV-Visível, onde é possível verificar que a proteína reconstituída possui uma maior absorção a comprimentos de onda inferiores a 450 nm (após normalização dos espectros a 492 nm). Devido ao facto de o centro binuclear contribuir para a absorção a esses comprimentos de

onda (com um máximo a 365 nm), este aumento na absorção é tomado como uma indicação de um aumento na quantidade de centro binuclear. Uma prova substancial vem do espectro de Mössbauer da proteína reconstituída em ^{57}Fe . Neste espectro, aproximadamente 25% do total da absorção pode ser atribuído aos centros do tipo rubredoxina (22% no estado oxidado), 54% aos centros binucleares (12% estando no estado de valência mista $\text{Fe}^{2+}\text{-Fe}^{3+}$, activo em RPE) e os restantes 21% a ferro adventício ligado à proteína (resultante do excesso de ferro usado na reconstituição). Estas percentagens estão de acordo com o espectro de RPE (quantificação de spins para a forma semi-reduzida do centro binuclear) e com a determinação do conteúdo em ferro (7.5 átomos de ferro por dímero). As percentagens citadas indicam uma razão 1:1 entre os centros binucleares e os centros do tipo rubredoxina. Assim, pensa-se que na proteína nativa parte dos centros não possuem átomos de ferro.

A estrutura primária da rubreritina de *D. vulgaris* foi já obtida por sequência de ácidos aminados⁶ e por derivação da sequência do gene.⁷ Esta sequência revela uma cadeia polipeptídica com 191 ácidos aminados cujo peso molecular calculado é de 21.5 kDa, valor bastante semelhante ao anteriormente determinado. Comparação da sequência da rubreritina com a das rubredoxinas, revela uma forte homologia com o padrão de cisteínas presente nestas últimas. A parte C-terminal da rubreritina (sequência compreendida entre os resíduos 153 a 191) contém 4 resíduos de cisteína ordenados de forma idêntica aos das rubredoxinas, como podemos ver na comparação com a rubredoxina de *D. vulgaris* que se apresenta de seguida:

158	161	174	177
DvRr	Cys-x-x-Cys-Gly-Tyr-x[5]-Gly-x-Pro-x[2]-Cys-Pro-x-Cys-x[2]-Pro		
DvRd	Cys-x-x-Cys-Gly-Tyr-x[5]-Gly-x-Pro-x[18]-Cys-Pro-x-Cys-x[2]-Pro		
6	9	39	42

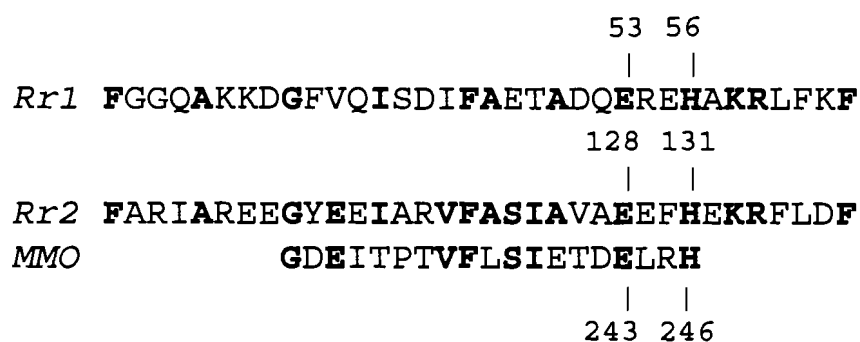


Figura V.3 - Comparação parcial da sequência da rubreritrina *D. vulgaris* com a redutase da mono-oxigenase do metano (MMO) de *M. capsulatus*. Alinhamento das regiões homólogas (Rr1 e Rr2) que contêm o padrão Glu-x-x-His (Adaptado de 8).

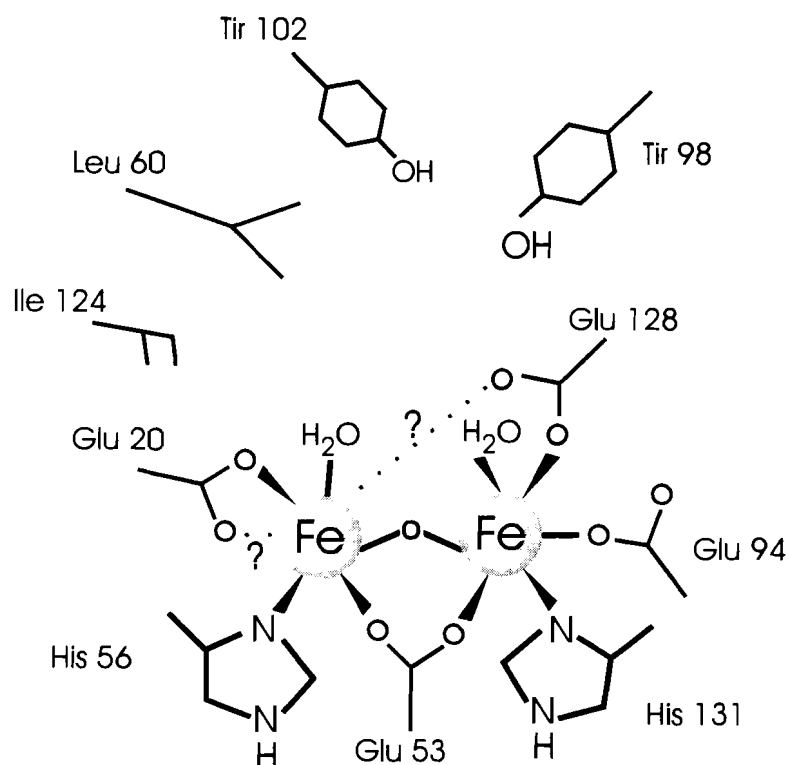


Figura V.4 - Modelo de coordenação do centro binuclear da rubreritrina de *D. vulgaris* proposto por Ravi e colaboradores (Adaptado de 4).

Para além das cisteínas, também alguns outros resíduos estão conservados, caso das prolinas 171, 175 e 180 que podem influenciar o arranjo conformacional dos ligandos em volta do centro.

A análise do resto da sequência revelou a existência de uma sequência semelhante às presentes na mono-oxigenase do metano e na subunidade R2 da redutase de ribonucleotídeos. Esta sequência, Glu-x-x-His, aparece duas vezes na cadeia polipeptídica da rubreritina em regiões com acentuada homologia (ver figura V.3)⁸. O facto de existirem duas destas regiões é também indicativo da existência de um centro binuclear por cadeia polipeptídica. Assim baseado nesta análise e em concordância com dados da espectroscopia de Mössbauer, foi proposto um modelo para a possível coordenação do centro binuclear⁴ (ver figura V.4).

Os potenciais de oxidação-redução dos centros, determinados por titulações redox por RPE, revelam-se bastante elevados: +230 mV (pH = 8.6¹) ou +281 mV (pH = 7.0³) para o centro do tipo rubredoxina; +339 e +246 mV (pH = 7.0³) para o centro binuclear. Estes potenciais são invulgarmente elevados, especialmente no caso do centro do tipo rubredoxina cujos potenciais são tipicamente inferiores em cerca de 250 mV. Uma possível explicação provém do facto de existirem duas argininas, com resíduos laterais carregados positivamente, posicionadas exactamente antes e depois da primeira cisteína que se pensa estar envolvida na ligação ao centro do tipo rubredoxina.

Recentemente foi descrito o isolamento, a partir de extratos celulares de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, de uma proteína semelhante à rubreritina, à qual foi dado o nome de nigeritina.³ Esta proteína é também um dímero com a mesma composição de grupos prostéticos. A massa molecular de cada subunidade é de 27 kDa. Os centros presentes apesar de serem muito semelhantes apresentam algumas diferenças a nível espectroscópico. Os potenciais de oxidação-redução destes centros são ligeiramente inferiores aos da rubreritina.

V.2. Purificação.

O método de crescimento das células de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 e de obtenção do extrato celular será descrito no apêndice A (métodos). A primeira etapa da purificação é essencialmente comum para o isolamento das proteínas descritas neste e nos dois próximos capítulos. Todos os procedimentos foram efectuados a cerca de 4° C e a pH=7.6, excepto nos casos em que for indicado em contrário.

O extrato celular, com o volume aproximado de 1 litro (proveniente de 240 g de células), foi aplicado numa coluna (6 x 32.5 cm) com um enchimento de dietil-amino-etilcelulose (DEAE-52 Whatman) e equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM. A coluna foi então lavada com o volume de tampão Tris-HCl 10 mM necessário para eluir as proteínas que devido ao seu alto ponto isoeléctrico não ficam adsorvidas à resina (na maioria citocromos). De seguida foi aplicado um gradiente linear de tampão Tris-HCl de 10 a 300 mM, com um volume total de 3 litros. A fracção eluída a cerca de 100 mM continha citocromos e desulfoferrodoxina (ver capítulo VI). A fracção foi então concentrada num "diaflo" equipado com uma membrana YM5 (Amicon) e a força iónica foi diminuída por sucessivas adições de água bidestilada.

O passo seguinte da purificação consistiu na aplicação da amostra anterior num sistema de HPLC equipado com uma coluna MonoQ HR16/10 (Pharmacia). Aplicou-se um gradiente linear de tampão NaCl em 0.01 M de fosfato de potássio (pH=7.0), entre 10 e 200 mM com um caudal de 3.0 ml/min durante 120 minutos. No início do gradiente foi eluída uma fracção contendo rubreritrina e citocromos. Esta fracção foi concentrada e baixou-se a força iónica da forma atrás indicada. Este passo foi repetido uma segunda vez e foi obtida uma fracção de rubreritrina (aproximadamente 40 mg) com uma razão A_{280}/A_{493} igual a 5.2. A pureza desta fracção foi avaliada através de uma electroforese em gel de poliacrilamida na presença de 1% de dodecilsulfato de sódio (SDS).

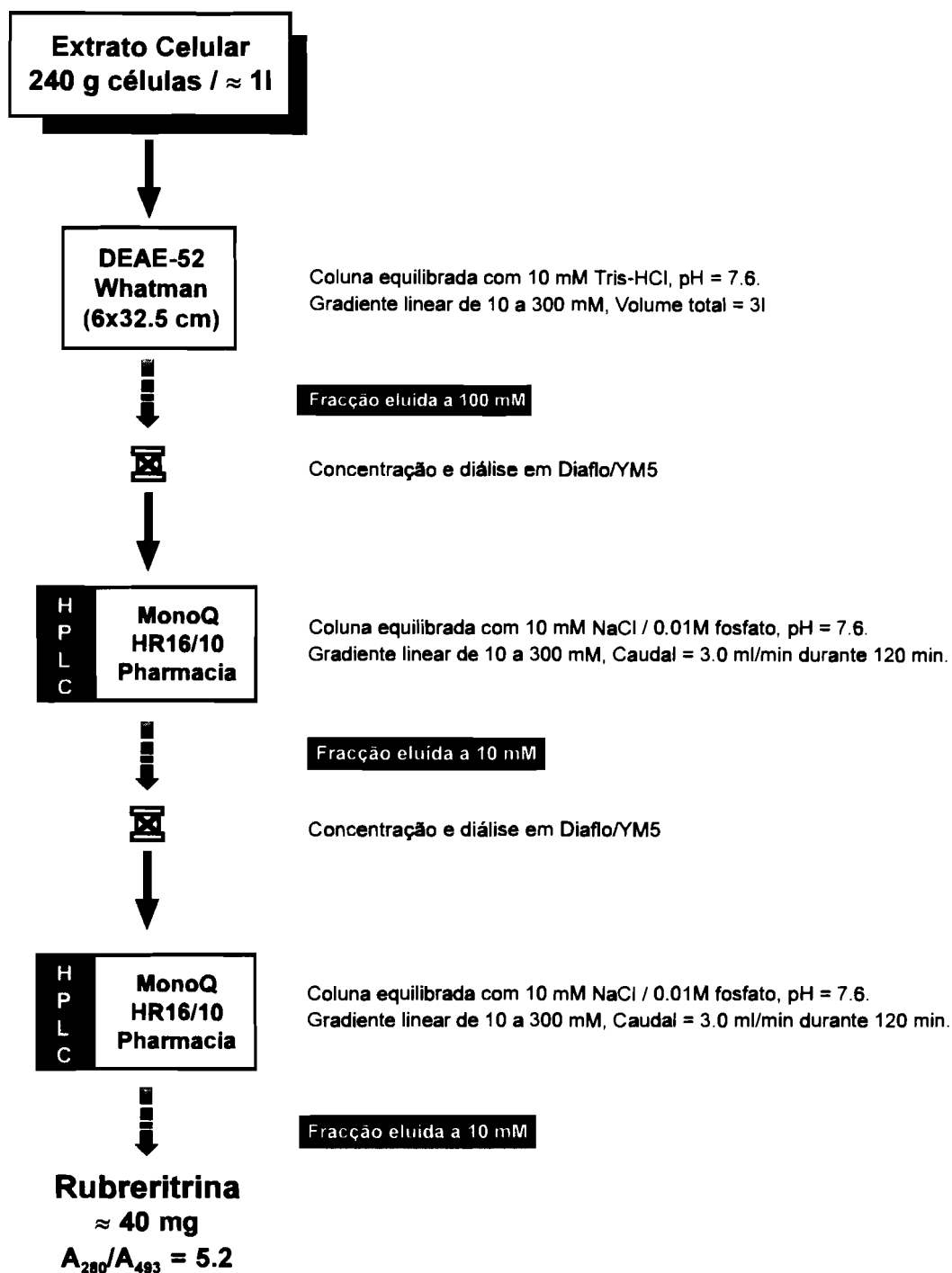


Figura V.5 - Esquema da purificação da rubreritina a partir do extrato celular de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

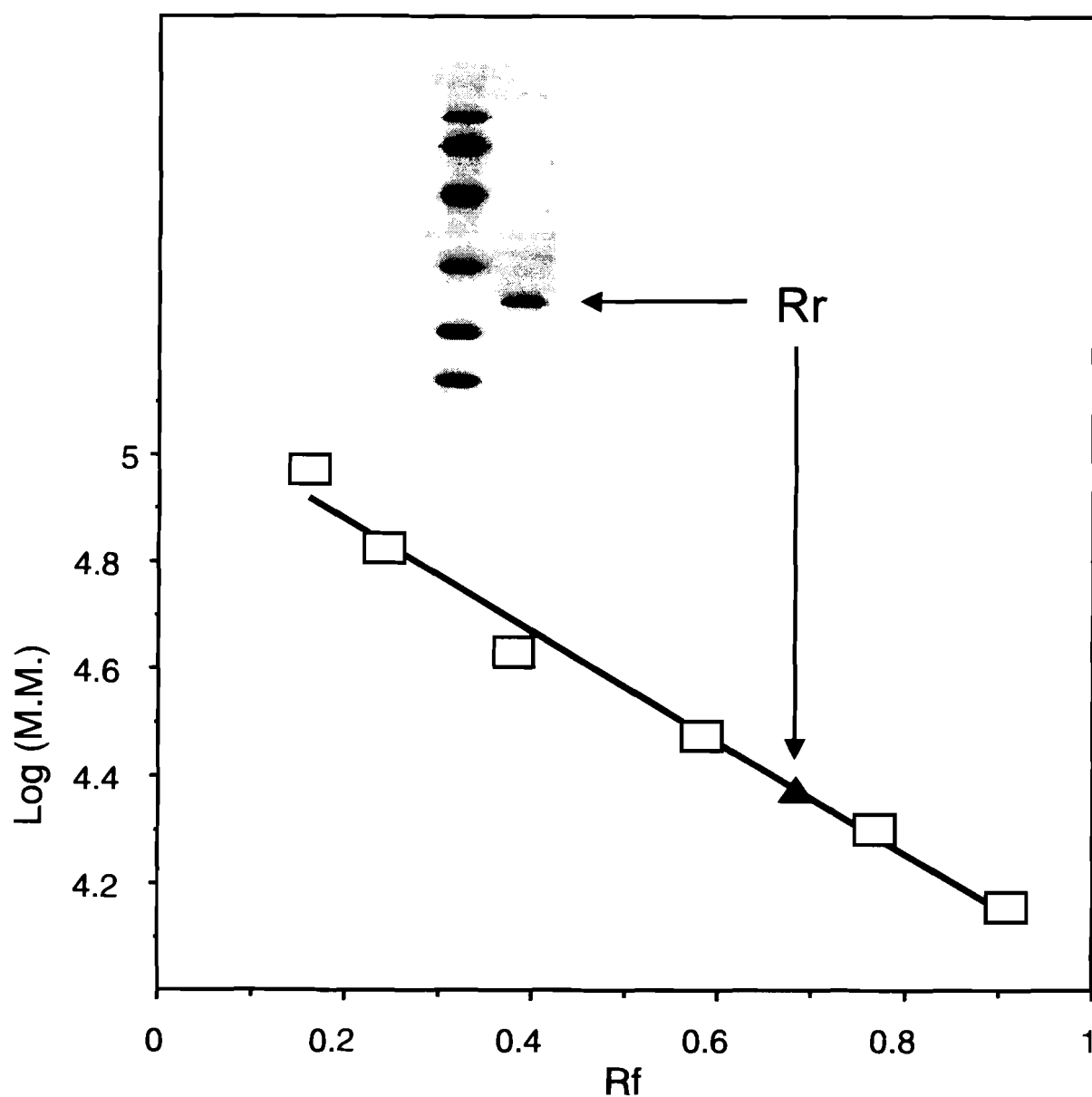


Figura V.6 - Determinação da massa molecular da rubreritina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 através de uma electroforese em gel de poliacrilamida (12.5%) na presença de 1% de SDS.

V.3. Determinação da massa molecular.

A massa molecular da rubreritina de *D. desulfuricans* ATCC 27774, foi determinada por electroforese em gel de poliacrilamida na presença de 1% de SDS⁹ (ver apêndice A - Métodos). O valor obtido, por monómero, foi de 24 ± 0.3 kDa (ver figura V.6).

V.4. Determinação do conteúdo em ferro.

A determinação da concentração de ferro nas amostras foi efectuada utilizando a espectroscopia de emissão de plasma e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (ver apêndice A - Métodos) ou utilizando o valor do coeficiente de extinção molar a 493 nm. Os cálculos foram baseados na massa molecular atrás determinada. Os valores obtidos para amostras purificadas de diferentes crescimentos estão descritos na tabela V.1. Os resultados são consistentes com o facto de existirem 3 átomos de ferro por monómero, tal como o descrito para a rubreritina isolada de *D. vulgaris*.

Tabela V.1

Valores obtidos para diferentes determinações do conteúdo em ferro da rubreritina de D. desulfuricans ATCC 27774.

Amostra	Ano*	Método usado para a determinação da proteína	Conteúdo em ferro (átomos de Fe/monómero)
Amostra I	1992	ϵ_{493}	2.8 ± 0.2
Amostra II	1991	Lowry	2.7 ± 0.1
Amostra III	1993	Lowry	2.9 ± 0.1

*Ano no qual foi efectuada a purificação da amostra e a correspondente determinação do conteúdo em ferro.

V.5. Determinação do N-terminal

Na determinação do N-terminal foi utilizado um sequenciador automático (Applied Biosystem 477A) acoplado a um analisador (Applied Biosystem 120A). Na figura V.7 compara-se a sequência obtida (40 resíduos), com o N-terminal da rubreritrina de *D. vulgaris*, bem como com a recentemente isolada nigeritrina.

	1			5						10
<i>RrDd</i>	Met	Lis	Ser	Leu	Lis	Gli	Tre	Gln	Tre	Glu
<i>RrDv</i>	Met	Lis	Ser	Leu	Lis	Gli	Ser	Arg	Tre	Glu
<i>Niger</i>	Met	Lis	Val	Arg	Ala	Gln	Val	Pro	Tre	Val
	11				15					20
<i>RrDd</i>	Lis	Asn	Ile	Leu	Tre	Ala	Fen	Ala	Gli	Glu
<i>RrDv</i>	Lis	Asn	Ile	Leu	Tre	Ala	Fen	Ala	Gli	Glu
<i>Niger</i>	Lis	Asn	Ala	Tre	Asn	—	—	—	—	—
	21				25					30
<i>RrDd</i>	Ser	Gln	Ala	Arg	Asn	Arg	Tir	Asp	Trp	Fen
<i>RrDv</i>	Ser	Gln	Ala	Arg	Asn	Arg	Tir	Asn	Tir	Fen
	31				35					40
<i>RrDd</i>	Ser	X	Val	Ala	Lis	Lis	Ile	Gli	Tir	Val
<i>RrDv</i>	Gli	Gli	Gln	Ala	Lis	Lis	Asp	Gli	Fen	Val

Figura V.7. Comparação das sequências do N-terminal das Rubreritrinas de *D. desulfuricans* ATCC 27774 e *D. vulgaris* e da Nigeritrina de *D. vulgaris*.

Como é possível verificar pela análise da figura V.7, a sequência dos primeiros 40 ácidos aminados da proteína isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774 possui 31 ácidos aminados em comum com o N-terminal da rubreritrina de *D. vulgaris*, o que equivale a uma homologia de 77.5%. Esta homologia é ainda maior se para efectuar esta análise for usado um programa de computador que considera uma matriz de substituição de ácidos aminados tal como a PAM250¹⁰. Esta matriz foi construída por comparação de várias proteínas relacionadas entre si, determinando a probabilidade de um dado ácido aminado ser substituído por outro. Assim, de acordo com essa matriz, substituições mais prováveis (p.e. Met → Leu) recebem uma pontuação positiva enquanto que substituições menos prováveis (p.e. Cys → Trp) recebem uma pontuação negativa. Utilizando o programa FASTP¹⁰ obteve-se, para a comparação dos primeiros 40 ácidos aminados das sequências das duas rubreritrimas, a pontuação de 147 (sendo o valor da pontuação igual a 188 para a total identidade entre as duas sequências). Os ácidos aminados considerados como substituições mais prováveis encontram-se circundados pelo traço mais fino, na figura V.7.

Por sua vez, a homologia é substancialmente menor entre a rubreritrina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 e a nigeritrina de *D. vulgaris*. A comparação dos N-terminais conhecidos revela que dos primeiros 12 ácidos aminados, apenas 5 são conservados (41.7 % de homologia). O uso do referido programa de computador estende um pouco esta homologia, atribuindo duas prováveis substituições evolutivas, mas a homologia continua a ser baixa. Com efeito, a pontuação obtida para esta homologia é igual a 12 (sendo a pontuação obtida para o caso de total identidade dos 12 ácidos aminados igual a 58).

V.6. Determinação da composição em ácidos aminados.

Na tabela V.2 apresenta-se a composição de ácidos aminados da rubreritrina, obtida por hidrólise ácida¹¹ (ver apêndice A - Métodos). Para determinação dos resíduos de cisteínas foi efectuada primeiramente uma oxidação perfórmica. Os resultados obtidos foram calculados tendo por base a massa molecular de 24 kDa.

Tabela V.2

*Composição de ácidos aminados da rubreritrina (D.d.27774).
Comparação com a composição obtida para a rubreritrina de
D. vulgaris estirpe Hildenborough.*

Ácido aminado	D.d. 27774	D.v. [⊙]
Asp + Asn	12	13
Tre	6	7
Ser	9	7
Glu + Gln	34	27
Gli	15	15
Ala	30	27
Cis	4	4
Val	10	6
Met	5	2
Ile	7	12
Leu	15	11
Tir	5	6
Fen	10	14
His	4	8
Lis	13	11
Arg	7	14
Pro	6	5
Trp	(ND)	2
Total de ácidos aminados	192	191
Massa molecular (Da)	24333	21995

ND - Não determinado; [⊙] Dados provenientes da sequência da proteína (ver referências 6 e 7).

V.7. Estudos espectroscópicos.

V.7.1. Espectroscopia de UV-Visível.

O espectro de visível da rubreritrina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 apresenta máximos de absorvância a 280, 370 e 493 nm (ver figura V.8). A razão entre a absorvância a estes dois últimos comprimentos de onda é de 1.85. Os valores do coeficiente de extinção molar a 370 e 493 nm, calculados por monómero, são respectivamente 13400 e 7200 M⁻¹cm⁻¹. Este valor é muito aproximado aos valores publicados para as rubredoxinas (≈ 7000 M⁻¹cm⁻¹), estando em acordo com a pretensão de a rubreritrina possuir um centro do tipo rubredoxina por monómero.

Seguindo uma metodologia idêntica à usada para a proteína de *D. vulgaris*¹, subtraíu-se ao espectro da Rr de *D. desulfuricans* ATCC 27774 o espectro da rubredoxina do mesmo organismo (após normalização a 493 nm, ver figura V.8c). O espectro resultante apresenta um máximo de absorvância a 362 nm, cujo valor do coeficiente de extinção molar é 5650 M⁻¹cm⁻¹ (valor calculado por monómero), e por uma banda alargada a 460 nm. O valor estimado para o coeficiente de extinção molar é maior que o obtido para a rubreritrina de *D. vulgaris* e mais aproximado aos valores descritos para o centro binuclear da hemeritrina. Esta observação leva a pensar que na rubreritrina isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774 a quase totalidade das moléculas possuem dois centros binucleares (i.e. um centro binuclear por monómero).

Por redução com ascorbato de sódio obtém-se o espectro da figura V.8d, no qual é possível observar que deixou de existir absorção significativa a comprimentos de onda superiores a 400 nm. O mesmo efeito é observado por redução com ditionito de sódio, como se pode verificar na figura V.8e.

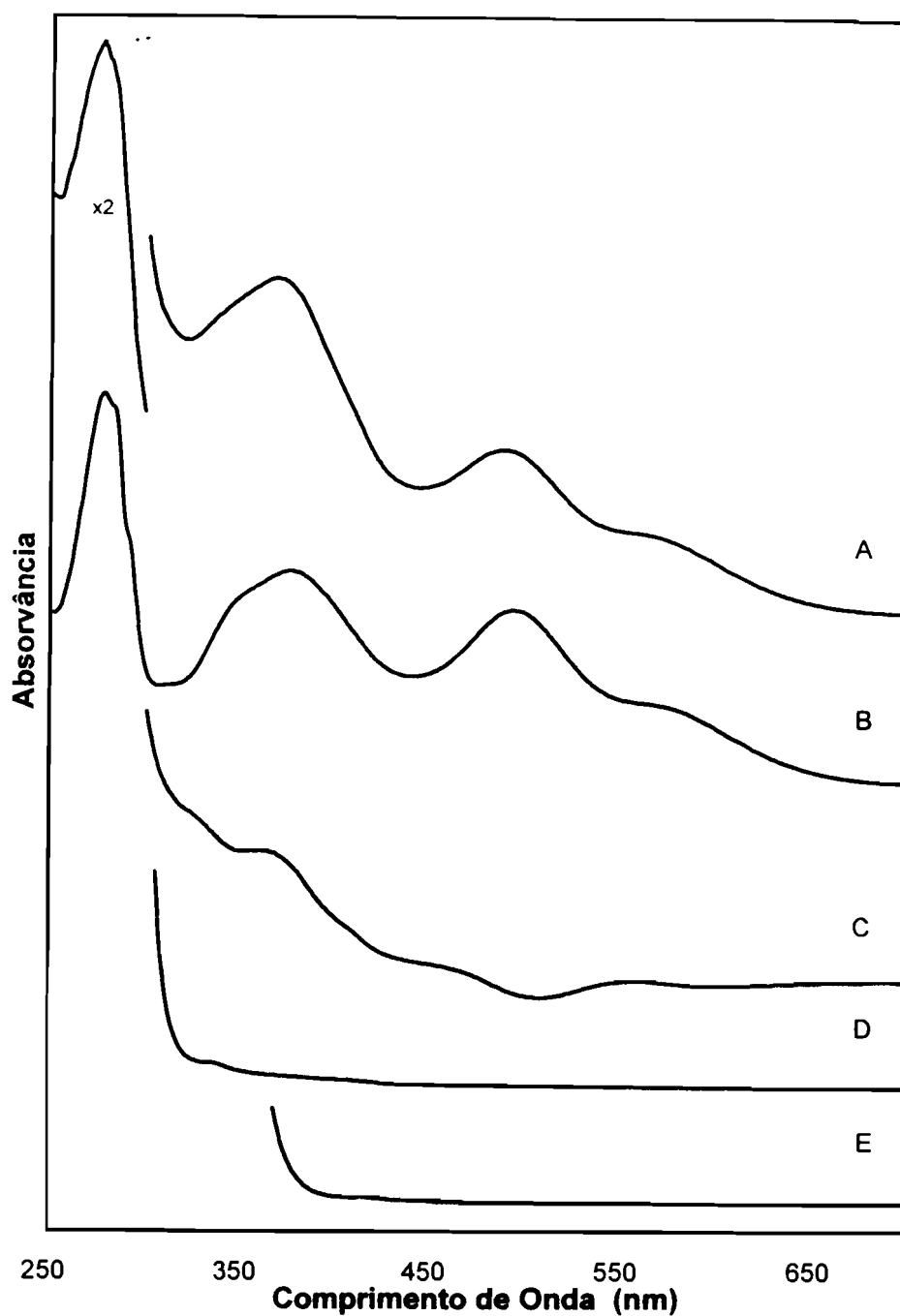


Figura V.8 - Comparação do espectro de UV-visível da rubreritrina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (A) com o espectro da rubredoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (B). O espectro C representa a subtração entre os dois espectros anteriores (A-B), após normalização da intensidade a 493 nm. Os espectros D e E foram adquiridos após redução com ascorbato e ditionito de sódio, respectivamente.

V.7.2. Espectroscopia de RPE.

O espectro de RPE da rubreritina de *D. desulfuricans* ATCC 27774, na sua forma nativa, contém dois grupos distintos de ressonâncias (ver figura V.9). O sinal mais intenso do espectro provém dos centros do tipo rubredoxina no estado oxidado. Este sinal possui ressonâncias a $g = 9.6$ e 4.3 , típicas para um ião férrico de alto spin ($S = 5/2$) com $E/D \approx 1/3$ e $D > 0$. Neste caso a ressonância a $g = 4.3$ é atribuída ao dobleto de kramer com $m_s = \pm 3/2$ e a ressonância a $g = 9.6$ ao dobleto de kramer com $m_s = \pm 1/2$ (estado fundamental).

Para além do sinal do tipo rubredoxina existe ainda um outro sinal com ressonâncias a $g = 1.98$, 1.76 e 1.56 . Este sinal é muito semelhante ao obtido para o estado semi-reduzido dos centros binucleares de ferro do tipo hemeritina (ver capítulo III). Assim, e tal como na rubreritina de *D. vulgaris*, este sinal é atribuído à forma semi-reduzida do centro binuclear. Nesta forma um dos ferros está no estado férrico ($S = 5/2$) e o outro no estado ferroso ($S = 2$). O acoplamento antiferromagnético dos dois ferros resulta num centro binuclear com $S = 1/2$ e consequentemente um espectro de RPE com valores de g a campo alto (região de $g = 2$).

Na figura V.10 mostra-se a simulação deste espectro de RPE, para a qual foram usados os parâmetros da tabela V.3.

Tabela V.3

Parâmetros usados para simulação do espectro de RPE da forma semi-reduzida da rubreritina de D. desulfuricans ATCC 27774 (4.2 K).

	valor de g	Largura de linha (gauss)
g_x	1.987	37.0
g_y	1.762	60.0
g_z	1.564	250.0

A dependência deste sinal com a potência da micro-onda aplicada foi estudada a três diferentes temperaturas: 4.2, 5.0 e 6.1 K. O alargamento das linhas, no espectro de RPE, não é por vezes homogénio. Este facto deve-se a factores como as interacções hiperfinas, interacções dipolares entre os spins com diferentes frequências de Larmor, anisotropia no desdobramento dos níveis de spin e heterogeneidades nas populações dos centros metálicos. A dependência da intensidade do sinal com a potência para um sistema de spin heterogénio é dada pela seguinte equação¹²:

$$S \propto \frac{\sqrt{P}}{\left(1 + \frac{P}{P_{1/2}}\right)^{\frac{b}{2}}}$$

Sendo S a amplitude do sinal, $P_{1/2}$ a potência necessária para se atingir 50% de saturação e b o "parâmetro de não-homogeneidade". Este parâmetro toma o valor de 1.0 para linhas não homogeneamente alargadas e 4.0 para as homogeneamente alargadas. Existem no entanto uma grande variedade de situações intermediárias entre estes casos limite.

Neste tipo de estudo duas representações gráficas são possíveis: i) $S = f(\sqrt{P})$; ii) $\log\left(\frac{S}{\sqrt{P}}\right) = f(\log P)$ ¹³. De acordo com a primeira, foi efectuado um ajuste não linear às curvas obtidas para a proteína purificada de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (ver figura V.11). Os parâmetros obtidos encontram-se descritos na tabela V.4.

A 4.2 K o sinal apresenta uma forte dependência da potência, apresentando um valor de $P_{1/2}$ mais baixo que o obtido para a rubreritina de *D. vulgaris*, na qual $P_{1/2} = 4$ mW.³ O sinal satura para potências ligeiramente superiores a 1 mW. No entanto a saturação deste sinal é extremamente dependente da temperatura, pois um pequeno incremento de cerca de 1 K faz com que o valor de $P_{1/2}$ seja aproximadamente 18 vezes maior. Novo incremento faz com que seja praticamente impossível saturar o sinal.

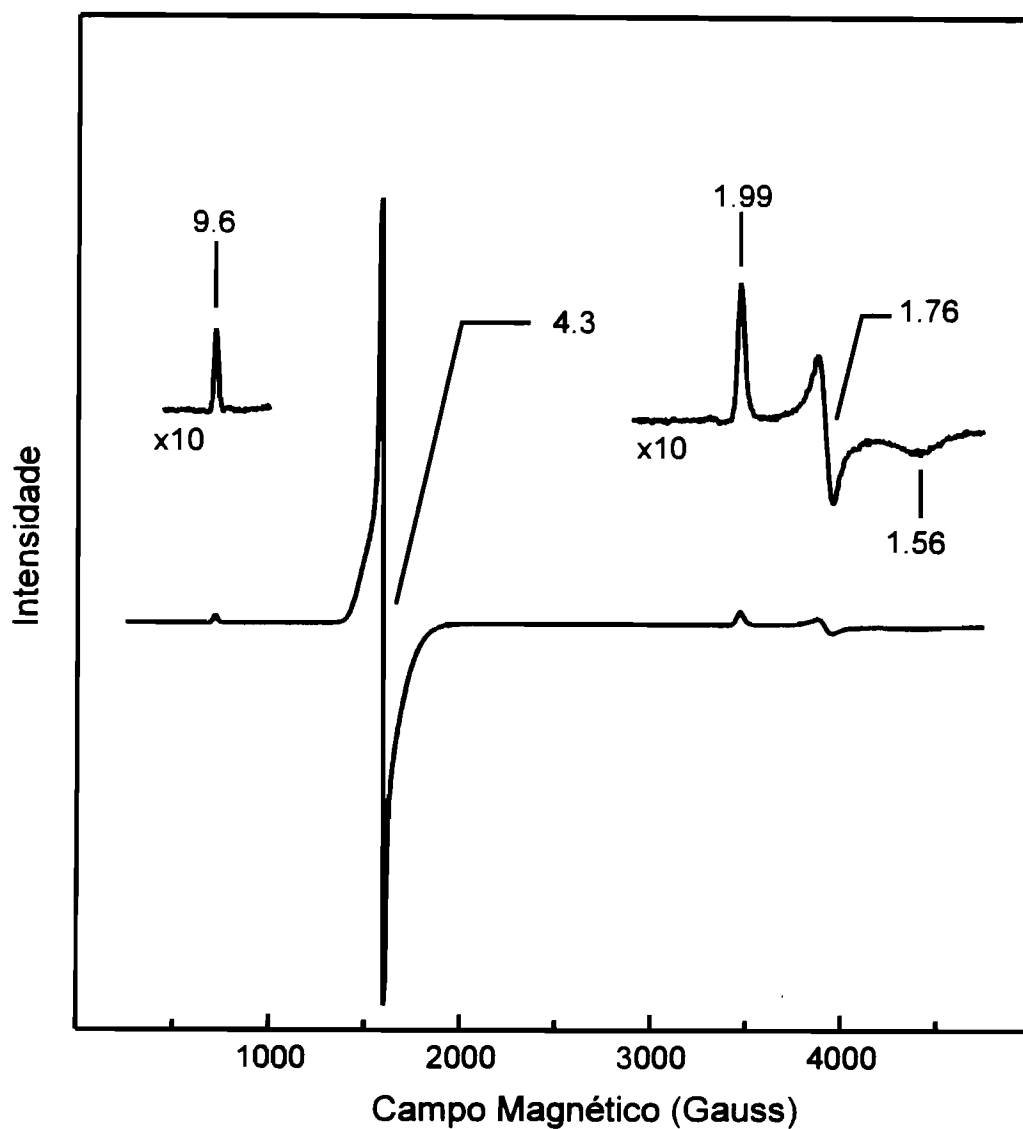


Figura V.9 - Espectro de RPE da rubreritrina de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

Condições experimentais: temperatura, 4.3 K, frequência da micro-onda igual a 9.644 GHz, potência da micro-onda igual a 0.78 mW, amplitude de modulação igual a 9.01 mT e ganho igual a 6.3×10^3 .

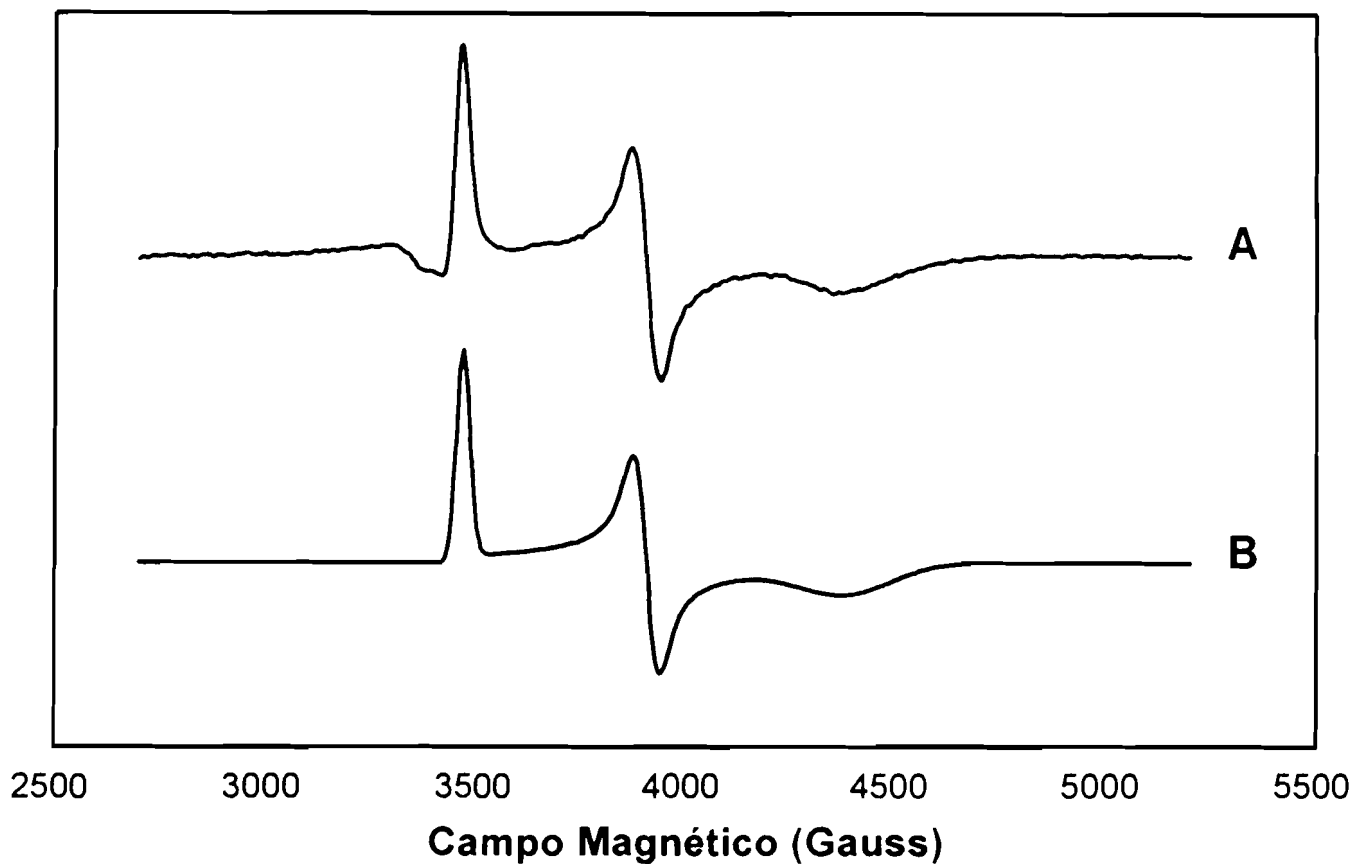


Figura V.10 - Espectro de RPE da rubreritrona de *D. desulfuricans* ATCC 27774 a campo baixo (A). Condições experimentais: temperatura, 4.3 K, frequência da micro-onda igual a 9.636 GHz, potência da micro-onda igual a 780 μ W, amplitude de modulação igual a 9.01 mT e ganho igual a 4×10^5 . O espectro B representa a simulação obtida com os parâmetros da tabela V.3.

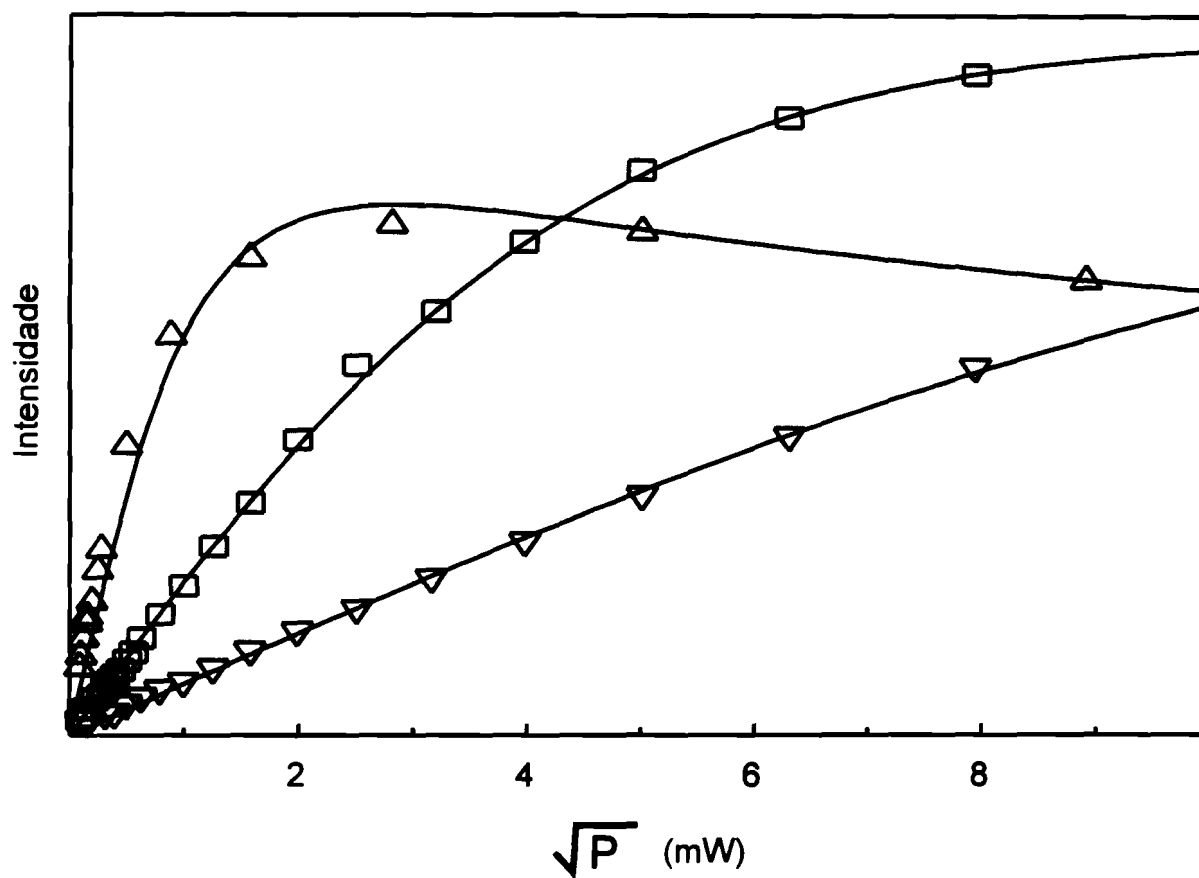


Figura V.11 - Curvas de saturação da ressonância a $g = 1.76$, do espectro de RPE da rubreritina de *D. desulfuricans* ATCC 27774. As curvas foram obtidas a 4.2 K (Δ), 5.0 K (\square) e 6.1 K (∇). As linhas sólidas representam o ajuste efectuado a cada uma das curvas (parâmetros da tabela V.4).

Tabela V.4

Parâmetros obtidos do ajuste da curva de dependência da intensidade do sinal a $g = 1.76$ com a potência da micro-onda aplicada.

Temperatura (K)	$P_{1/2}$ (mW)	χ^2
4.2	1.94 ± 0.47	0.01
5.0	36.8 ± 3.0	0.39
6.1	≥ 300	0.58

$$b = 1.2 \pm 0.1$$

V.7.3. Espectroscopia de Mössbauer.

O espectro de Mössbauer da rubreritina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (Amostra I) adquirido a 4.2 K na presença de um campo magnético (500 G) aplicado paralelamente à radiação γ , revela-nos a existência de quatro componentes, duas das quais associadas aos centros binucleares (ver figura V.12).

Tal como na rubreritina de *D. vulgaris*, no centro do espectro (picos a -0.23 e +1.32 mm/s) existe um dobleto de quadrupolo com parâmetros típicos para centros binucleares do tipo existente na redutase de ribonucleotídeos ou na hemeritina, no estado totalmente oxidado. Neste caso os valores calculados foram os seguintes: $\Delta E_Q = 1.61$ mm/s e $\delta = 0.54$ mm/s. No entanto, e contrariamente ao observado na rubreritina de *D. vulgaris*, a este dobleto de quadrupolo pode ser atribuída aproximadamente 35% da absorção total do espectro.

Uma outra componente contribui com cerca de 15% para a absorção total do espectro. Trata-se de uma componente magnética (com picos entre -5.40 e +6.45 mm/s) que pode ser simulada usando o hamiltoneano de spin descrito no capítulo IV. Os parâmetros utilizados na simulação, descritos na tabela V.2, são muito semelhantes aos obtidos para o estado oxidado das rubredoxinas (ver capítulo II) e consistentes com os dados de RPE.

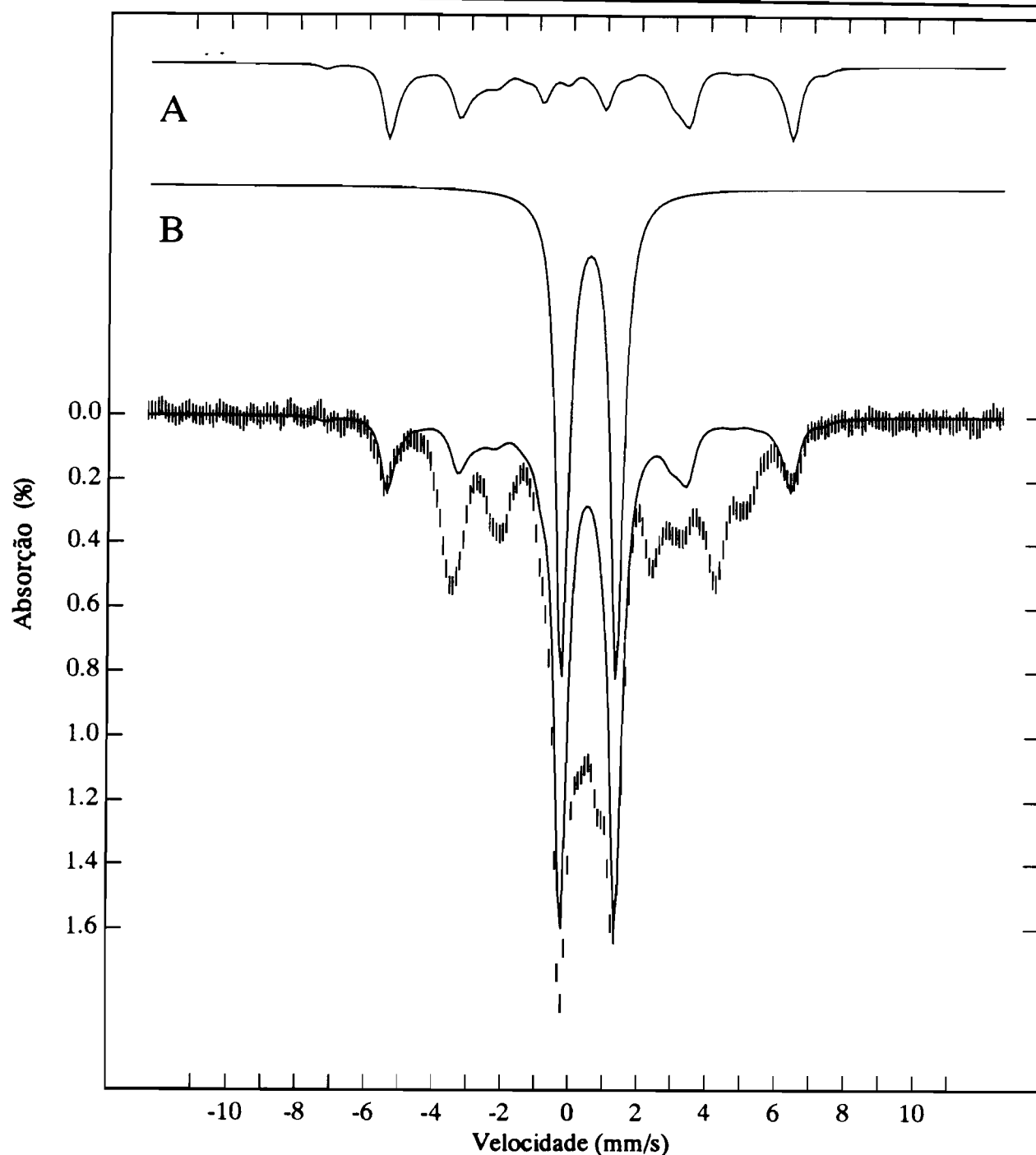


Figura V.12 - Espectro de Mössbauer da forma nativa da rubreritina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (Amostra I). Condições experimentais: temperatura, 4.2 K; campo magnético aplicado, 500 G. No topo do espectro apresentam-se os espectros simulados para a forma oxidada dos centros do tipo rubredoxina (A) e dos centros binucleares (B). A linha a cheio, sobreposta ao espectro experimental, resulta da soma de 15% da componente A e 35% da componente B. Os parâmetros utilizados na simulação estão descritos na tabela V.5.

Tabela V.5

*Parâmetros usados para simulação do espectro de Mössbauer dos estados totalmente oxidado dos centros presentes na rubreritina de **D. desulfuricans** ATCC 27774. Comparação com a proteína homóloga de **D. vulgaris**.*

	Centros do tipo rubredoxina		Centros binucleares	
	<i>D. desulfuricans</i> ATCC 2774	<i>D. vulgaris</i>	<i>D. desulfuricans</i> ATCC 2774	<i>D. vulgaris</i>
D (cm ⁻¹)	1.3	1.5 ± 0.5	—	—
E/D	0.25	0.26 ± 0.03	—	—
ΔEQ (mm/s)	-0.55	-0.55 ± 0.10	1.61	1.47 ± 0.05
η	0.9	0.7 ± 0.4	—	—
Ax, Ay, Az (kG)	-165, -156, -170	-165 ± 10, -156 ± 5, -170 ± 5	—	—
δ (mm/s)	0.27	0.27 ± 0.04	0.54	0.52 ± 0.03
Γ (mm/s)	0.4	—	0.45	—

Das duas restantes componentes, uma pode ser associada aos centros binucleares. Esta componente, responsável por cerca de 30% da absorção total do espectro, é uma espécie magnética com picos de absorção entre -3.50 e +5.13 mm/s. Após oxidação da amostra (com ferricianeto de potássio) esta componente desaparece, enquanto que a absorção do dobleto central atribuído ao estado diférrico do centro binuclear aumenta cerca de 30% (ver figura V.13). Este facto leva a pensar que esta segunda componente magnética provém do estado semi-reduzido ($S = 1/2$) dos centros binucleares. Com efeito, uma componente semelhante foi recentemente analisada para a redutase da mono-oxigenase do metano por Fox e colaboradores.¹⁴

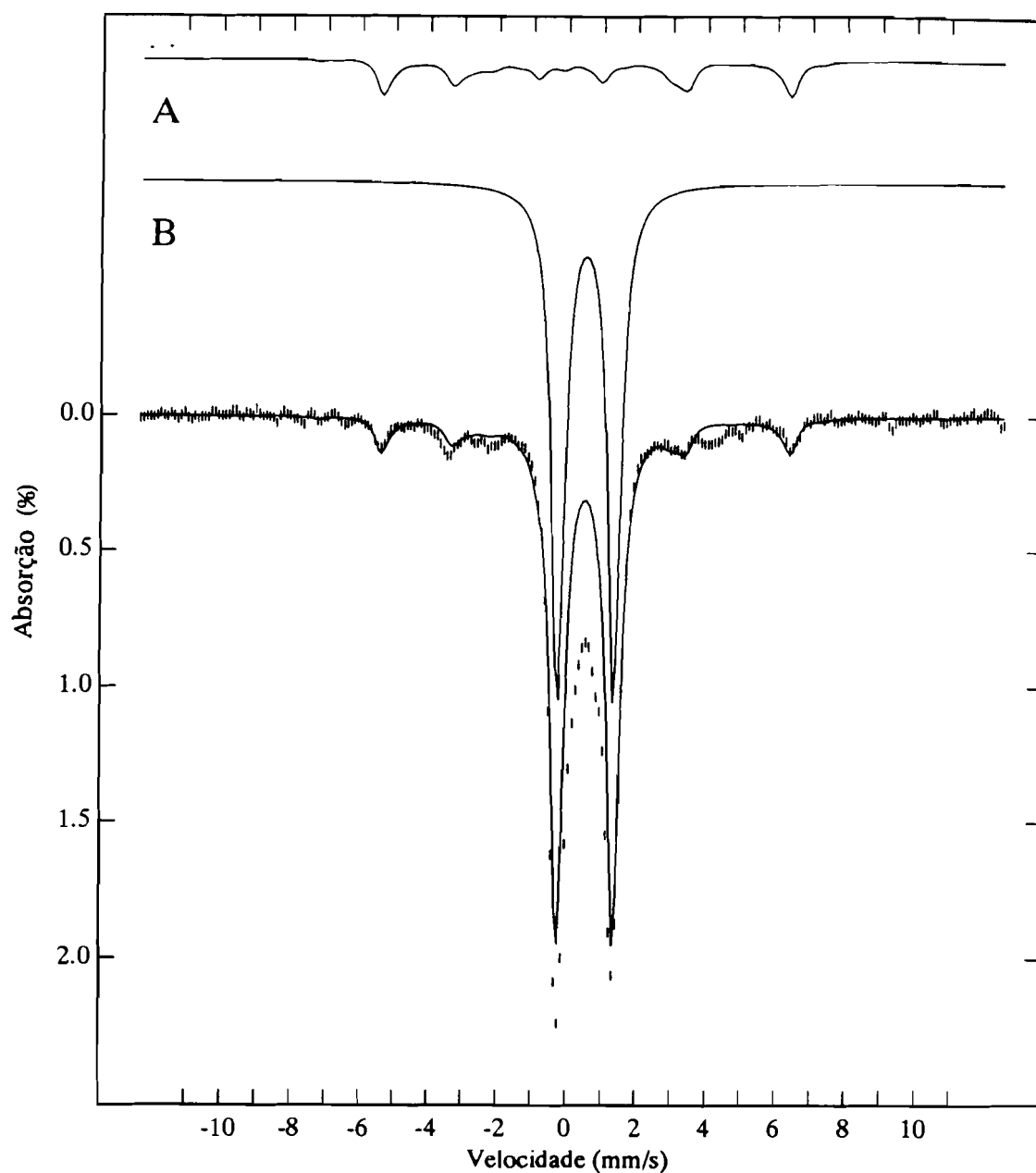


Figura V.13 - Espectro de Mössbauer da rubreritina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (Amostra I), após a reoxidação com ferricianeto de potássio. Condições experimentais: temperatura, 4.2 K; campo magnético aplicado, 500 G. No topo do espectro apresentam-se os espectros simulados para a forma oxidada dos centros do tipo rubredoxina (A) e dos centros binucleares (B). A linha a cheio, sobreposta ao espectro experimental, resulta da soma de 15% da componente A com e 62% da componente B. Os parâmetros utilizados na simulação estão descritos na tabela V.5.

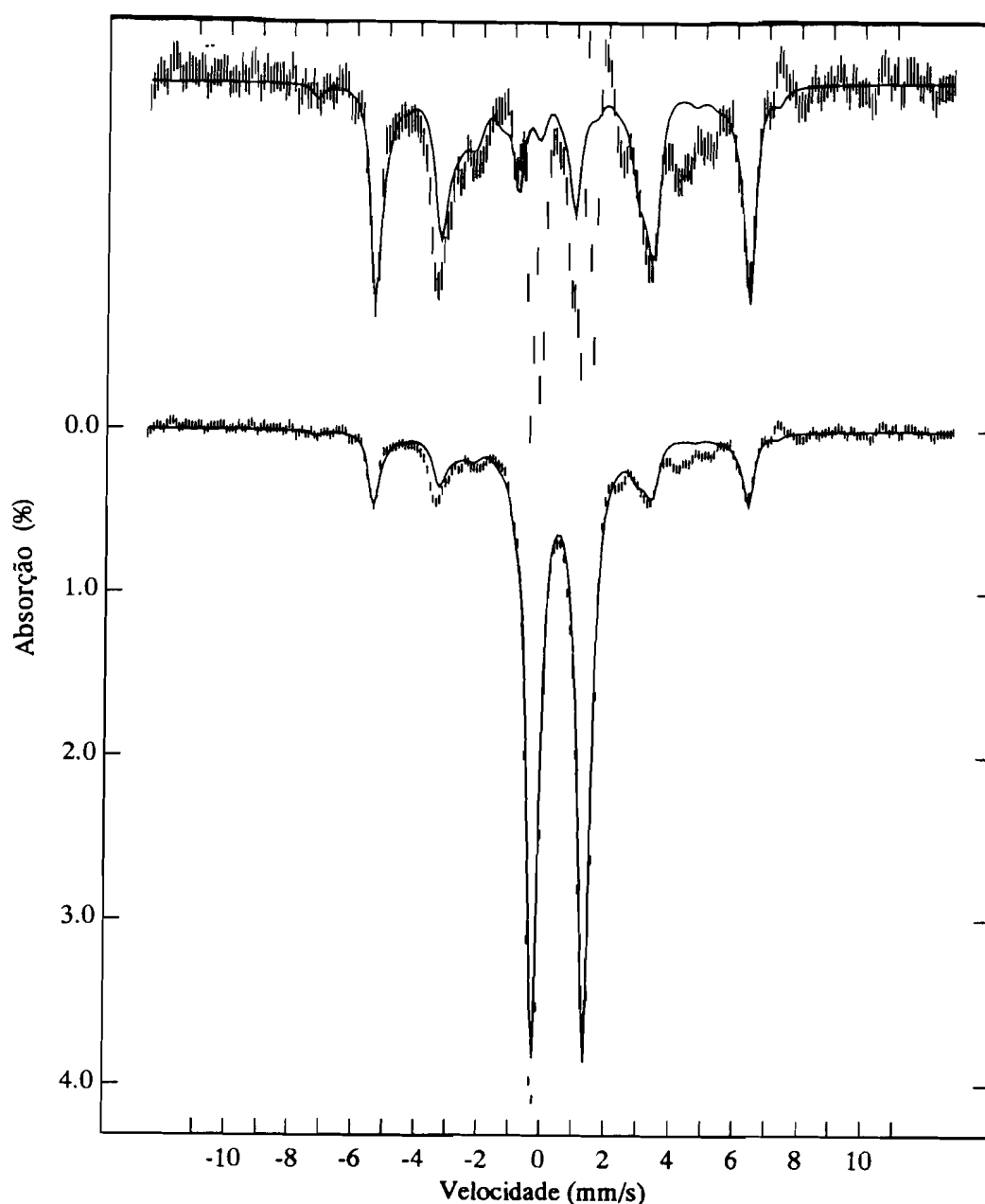


Figura V.14 - Espectro de Mössbauer da forma nativa da rubreritrona de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (Amostra II). Condições experimentais: temperatura, 4.2 K; campo magnético aplicado, 500 G. A linha a cheio, sobreposta ao espectro experimental, resulta da soma de 25% da componente magnética correspondente aos centros do tipo rubredoxina e 66% da componente correspondente aos centros binucleares. Os parâmetros utilizados na simulação estão descritos na tabela V.5. No topo apresenta-se o espectro (x3) após subtração desta última componente.

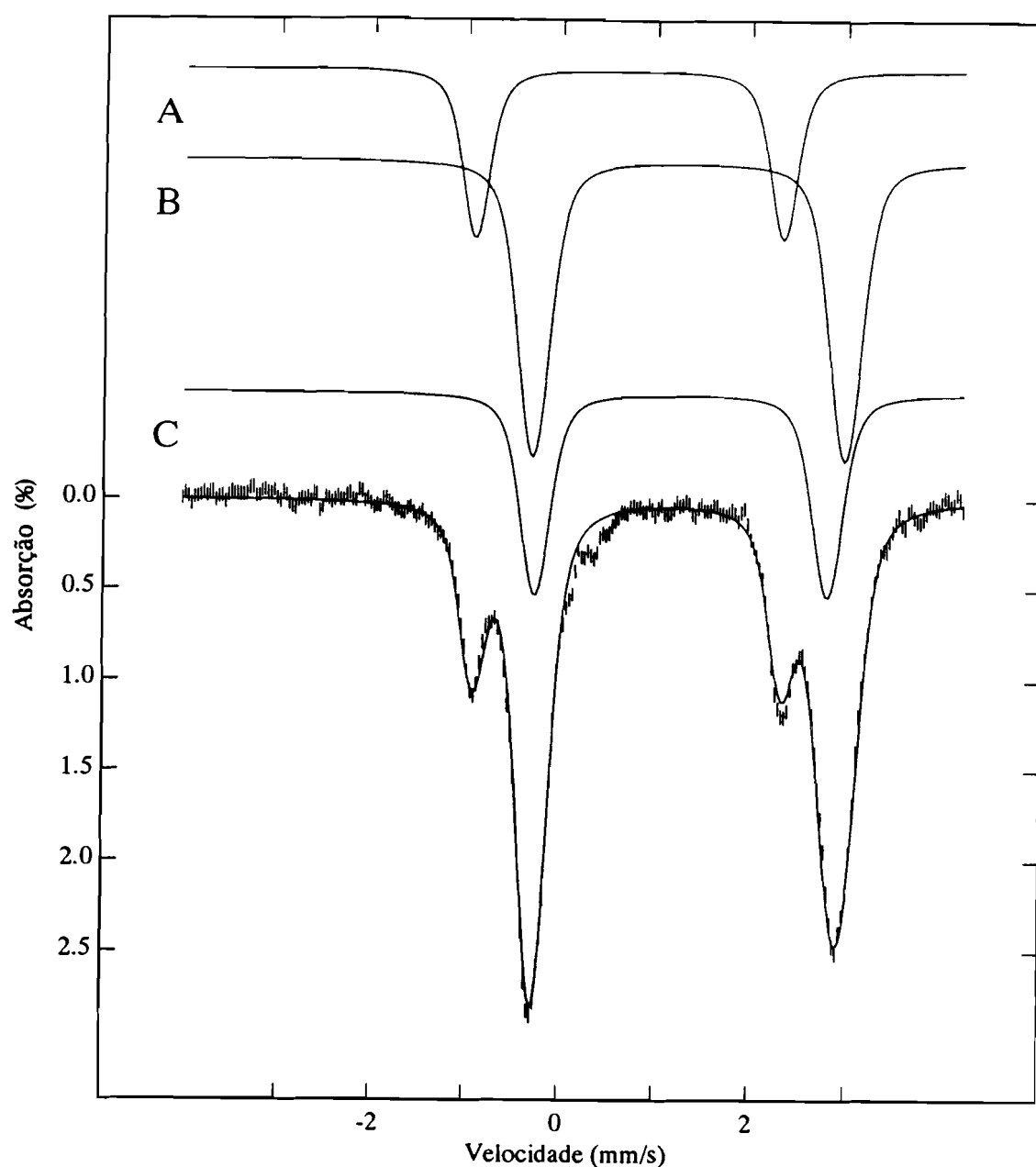


Figura V.15 - Espectro de Mössbauer da rubreritina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (Amostra II) após redução com ditionito de sódio. Condições experimentais: temperatura, 4.2 K; campo magnético aplicado, 500 G. A linha a cheio sobreposta ao espectro experimental resulta da soma das componentes A (centros do tipo rubredoxina, 23.6%), B (centros binucleares, 47.1%) e C (ferro adventício, 30.5%).

Finalmente, a quarta e última componente é constituída por um dobleto de quadrupolo com os seguintes parâmetros: $\Delta E_Q = 0.70$ mm/s e $\delta = 0.48$ mm/s. Esta espécie contém cerca de 17% da absorção total e mantém-se constante mesmo após a reoxidação com ferricianeto de potássio.

Estes dados conduzem a algumas conclusões que vêm reforçar os resultados já descritos pela espectroscopia de UV-Visível e de RPE. Mais uma vez podemos identificar a presença de dois tipos de centros distintos: i) centros do tipo rubredoxina (FeCis_4) e ii) centros binucleares μ -oxo. Uma das grandes vantagens da espectroscopia de Mössbauer é a possibilidade de determinar quantitativamente todas as espécies de ferro presentes nas amostras. Neste caso seria de esperar uma razão de 1:2 entre as espécies atrás indicadas.

No entanto esta razão é diferente do esperado. Com efeito, a percentagem atribuída aos centros do tipo rubredoxina é aproximadamente 3.5 vezes inferior à atribuída aos centros binucleares. A atribuição do dobleto de quadrupolo com $\delta = 0.48$ mm/s, contribuindo cerca de 17%, é também bastante difícil. Aparentemente este dobleto não está associado a nenhum dos dois únicos tipos de ferro que deveriam existir nas amostras. A possibilidade de esta espécie pertencer aos centros do tipo rubredoxina, sendo uma espécie com uma elevada velocidade de relaxação de spin electrónica, é negada por vários factores. Um desses factores é o valor do desvio isomérico que é demasiadamente elevado para um ferro coordenado tetraedricamente a cisteínas. Seria também de esperar que, no caso de estarmos na presença de uma espécie desse tipo, por aplicação de um campo magnético elevado, a referida espécie originasse num espectro típico de rubredoxina. Dados preliminares de medidas efectuadas a campos magnéticos elevados (45-80 kG) contrariam esta hipótese.

A presença de algumas das componentes referidas é dependente da amostra. Na figura V.14 apresenta-se o espectro de uma amostra nativa obtida de outro extrato bacteriano de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Nesta amostra, a componente anteriormente atribuída ao estado semi-reduzido dos centros binucleares não está presente. A simulação do espectro foi efectuada assumindo que o dobleto central correspondente à forma diférrica dos centros binucleares contém 66% da absorção total do espectro. Não é de estranhar que os centros

binucleares estejam na sua totalidade no estado diférrico, uma vez que o potencial de oxidação-redução destes centros é bastante elevado. Como tal a percentagem relativa de centros binucleares em cada um dos estados de oxidação deve depender de factores como o número de passos de purificação efectuados e natureza dos tampões utilizados. Podemos ainda efectuar duas outras observações significativas: i) a total ausência da espécie que possui um valor de desvio isomérico alto ($\delta = 0.48$ mm/s) e ii) o baixo valor de absorção (25%) obtido para a espécie magnética. No primeiro caso, a ausência da referida espécie leva-nos a concluir que esta é dependente da preparação. Esta espécie não pode ser atribuída a uma impureza da amostra I, pois todos os outros critérios usados para avaliar a pureza das amostras (gel de poliacrilamida e espectro de UV-visível) apresentam resultados coerentes. Assim, os resultados parecem indicar que esta espécie resulta de um comportamento anómalo de parte dos ferros presentes na proteína, talvez devido a factores como a concentração da proteína e/ou potencial de oxidação de cada amostra. O facto de a espécie magnética contribuir apenas com 25% para a absorção total, implica que a razão entre ferros em centros binucleares e ferros em centros do tipo rubredoxina seja maior que o previsto (2.6:1 em vez de 2:1). Esta observação poderia ser explicada pela ocupação de alguns centros por átomos de zinco em substituição dos átomos de ferro (efeito já observado em rubredoxinas expressadas em *E. coli*). No entanto, outras observações parecem negar esta explicação. Com efeito, os resultados obtidos para a análise do conteúdo em ferro e para o valor do coeficiente de extinção molar a 493 nm são semelhantes nas diferentes amostras analisadas e apresentam valores próximos do esperado.

Por redução da amostra II com ditionito de sódio obtém-se o espectro da figura V.15. Este espectro pode ser ajustado com dois diferentes dobletos. Um dos dobletos contribui aproximadamente 20% para a absorção total e possui parâmetros semelhantes aos obtidos para os centros do tipo rubredoxina no estado reduzido (ver tabela V.6). O outro dobleto (picos de absorção a -0.29 e +2.91 mm/s) contém a restante absorção e os seus parâmetros são semelhantes aos obtidos para o centro binuclear da rubreritina de *D. vulgaris* no estado reduzido. Neste espectro as absorções relativas são também diferentes do esperado. Uma explicação possível é a presença de ferro ferroso adventício, proveniente da desnaturação da

proteína. Este tipo de ferro tem normalmente parâmetros semelhantes aos observados para os centros binucleares μ -oxo, contribuindo portanto na mesma região do espectro e tornando impossível a quantificação correcta dos referidos centros. Apesar de não existir resolução suficiente para distinguir mais do que os dois doubletos descritos, tentou-se efectuar o ajuste do espectro com três doubletos. Como é possível verificar pelo resultado (ver tabela V.3) cerca de 31% da absorção total do espectro é atribuída a ferro ferroso adventício ($\Delta E_Q = 3.08$ mm/s e $\delta = 1.27$ mm/s) e 47% aos centros binucleares ($\Delta E_Q = 3.28$ mm/s e $\delta = 1.34$ mm/s), obtendo-se assim a razão de 1:2 entre os centros do tipo rubredoxina e os centros binucleares.

Tabela V.6

Parâmetros obtidos por ajuste do espectro de Mössbauer da rubreritina de D. desulfuricans ATCC 27774 após redução com ditionito de sódio. Comparação com os parâmetros obtidos para a rubreritina de D. vulgaris.

Dobleto de quadrupolo	Tipo de centro	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	Γ (mm/s)	%	χ^2
<i>Ajuste com duas componentes</i>						
I	Rubredoxina	3.26	0.70	0.26	20	3.04
II	Binuclear ?	3.20	1.31	0.40	80	
<i>Ajuste assumindo três componentes</i>						
I	Rubredoxina	3.25	0.70	0.28	23.6	1.81
II	Binuclear	3.28	1.34	0.32	47.1	
II	Fe ²⁺ adventício ?	3.08	1.27	0.32	30.5	
<i>Parâmetros da rubreritina de D. vulgaris</i> ¹						
	Rubredoxina	3.15	0.70	0.30		
	Binuclear	3.14	1.30	0.45		

V.8. Discussão.

Tal como verificado para a proteína homóloga isolada de *D. vulgaris*, a rubreritina isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774 é uma proteína que contém uma associação invulgar de grupos prostéticos. A mesma cadeia polipeptídica contém a informação necessária para a ligação de um centro do tipo rubredoxina e para um centro binuclear semelhante ao encontrado na hemeritina ou na mono-oxigenase do metano. A composição de grupos prostéticos tem sido motivo de alguma controvérsia. No capítulo II foi possível verificar que nas proteínas que contêm centros binucleares deste tipo existiram diversos problemas na determinação do número de ferros por cadeia polipeptídica (ver tabela III.6). As determinações do conteúdo em ferro efectuadas para as diversas amostras da rubreritina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 são consistentes com a existência de um centro do tipo rubredoxina e de um centro binuclear, relação já confirmada pela cristalografia de raios-x para a proteína isolada de *D. vulgaris*.

As rubreritinas foram o primeiro tipo de proteínas onde um centro do tipo rubredoxina foi encontrado em associação com outro grupo prostético (no capítulo seguinte veremos um segundo exemplo deste tipo de associações).

V.9. Bibliografia

1. LeGall, J., Prickril, B.C., Moura, I., Xavier, A.V., Moura, J.J.G., e Huynh, B.H. (1988) *Biochemistry* 27, 1636-1642.
2. Garbett, K., Darnall, D.W., Klotz, I.M., e Williams, R.J.P. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 103, 419-434.
3. Pierik, A.J., Wolbert, R.B.G., Portier, G.L., Verhagen, M.F.J.M., e Hagen, W.R. (1993) *Eur. J. Biochem.* 212, 237-245.
4. Ravi, N., Prickril, B.C., Kurtz, D.M., Jr., e Huynh, B.H. (1993) *Biochemistry*, em impressão.
5. Zhang, J.-H., Kurtz, D.M., Jr., Xia, Y.-M., e Debrunner, P.G. (1991) *Biochemistry* 30, 583-589.
6. Van Beeumen, J.J., Van Driessche, G., Liu, M.-Y., e LeGall, J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 20645-20653.
7. Prickril, B.C., Kurtz, D.M., Jr., LeGall, J., e Voordouw, G. (1991) *Biochemistry* 30, 11118-11123.
8. Kurtz, D.M., e Prickril, B.C. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 181, 337-341.
9. Laemmli (1970) *Nature* 227, 680-685.
10. Lipman, D.J., e Pearson, W.R. (1985) *Science* 227, 1435-1441.
11. Moore, S., e Stein, W.H. (1963) *Methods Enzymol.* 46, 41-45.
12. Rupp, H., e Moore, A.L. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 548, 16-29.
13. Rupp, H., Rao, K.K., Hall, D.O., e Cammack, R. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 537, 255-269.
14. Fox, B.G., Hendrich, M.P., Surerus, K.K., Andersson, K.K., Froland, W.A., Lipscomb, J.D., e Münck, E. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 3688-3701.

Capítulo VI.

**A DESULFOFERRODOXINA DE
D. desulfuricans ATCC 27774**

VI. A Desulfoferrodoxina de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	153
1. Introdução.	155
2. Purificação	157
3. Determinação da massa molecular.	161
4. Determinação do conteúdo em ferros.	163
5. Determinação da composição em ácidos aminados	163
6. Determinação do N-terminal e sequência parcial	165
7. Estudos espectroscópicos.	170
7.1. Espectroscopia de UV-visível.	170
7.2. Espectroscopia de RPE.	176
7.3. Espectroscopia de Mössbauer.	189
8. Discussão.	200
9. Bibliografia.	207

VI.1. Introdução.

Como foi anteriormente descrito, as rubredoxinas são as proteínas de ferro enxofre com geometria de coordenação mais simples. O seu centro activo contém apenas um átomo de ferro coordenado a quatro cisteínas numa geometria tetraédrica. Pensa-se que estas proteínas tenham apenas uma função de transferência electrónica. A desulforedoxina (Dx) de *D. gigas* é uma proteína que contém um centro metálico semelhante. Neste caso o arranjo dos ligandos (cisteínas) em torno do átomo de ferro é tal que impõe uma rombicidade diferente ao centro (ver capítulo II). Até ao presente momento, esta proteína apenas foi isolada de extratos celulares de *D. gigas*.

Neste capítulo apresenta-se o estudo de uma proteína purificada de *D. desulfuricans* ATCC 27774 e *D. vulgaris* estirpe Hildenborough¹ que é, em parte, semelhante à Dx de *D. gigas*. Esta nova proteína foi denominada Desulfoferrodoxina, pois foi purificada pela primeira vez no estado semi-reduzido, estado no qual contém um centro do tipo Dx conjuntamente com outro centro monomérico no estado ferroso.

Em *D. vulgaris*, o gene de uma proteína homóloga à Desulfoferrodoxina foi clonado e sequenciado². Este gene foi encontrado num fragmento de 2.2-kb e está situado a montante do gene que codifica para a rubredoxina (designado por *rub*). Este gene é constituído por 378 pares de bases que codificam para uma proteína de massa molecular igual a 14 kDa. Foi designado de *rbo* e ao produto da sua transcrição deu-se o nome de oxidoreductase da rubredoxina, por se pensar que poderia codificar para o parceiro redox da rubredoxina (Rb).

A análise da sequência de nucleotídeos revelou a existência de um promotor a montante do gene *rbo* e, a jusante uma estrutura em "harpin-loop" que poderá ter a função de terminador da transcrição. Foi também possível isolar o produto da transcrição (do fragmento clonado), o que permitiu verificar que nele estão presentes ambos os genes *rbo* e *rub*. Estas observações parecem indicar que estamos na presença de um operão que contém os genes que codificam simultaneamente para a rubredoxina e para a proteína de 14 kDa.

A região N-terminal da sequência desta proteína, obtida por derivação da sequência do gene, apresenta grande semelhança com a sequência da desulforedoxina de *D. gigas* (tal

como foi observado para a sequência do N-terminal da proteína isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774). Se compararmos o N-terminal da rbo com a sequência da Dx de *D. gigas* podemos verificar que 19 dos 36 ácidos aminados são coincidentes e as quatro cisteínas presentes são conservadas. Estas são as cisteínas que na Dx foram originalmente propostas como ligandos do ferro. Outra região cuja homologia pode ser importante é a região que contém três glicinas (Gli-22, Gli-23, Gli-24) e que pode indicar a presença de um sítio de maior flexibilidade ("loop") nestas moléculas.

Uma das consequências das homologias atrás referidas é a possibilidade do gene *rbo* ter tido origem numa fusão de genes entre o gene da desulforedoxina e o gene de uma proteína com 10 kDa³. A sequência da Dx estaria compreendida entre a Met-1 e a Leu-35, enquanto que a sequência deste peptídeo começaria na Met-36 (ver figura VI.3). Dados provenientes da clonagem e sequência do gene que codifica para a desulforedoxina de *D. gigas* (designado por *dsr*) vieram apoiar esta possibilidade, estando em desacordo com a possibilidade de a desulforedoxina ser gerada por processamento proteolítico do produto do gene *rbo*. Foi possível verificar que apesar da elevada homologia (67%) dentro das regiões codificantes, fora delas não existe qualquer homologia. Outra observação interessante é a de existir uma metionina precisamente na posição 36, ou seja na posição onde começaria a codificação da proteína de 10 kDa.

Dados de hibridização permitiram verificar que o gene da rbo está presente em outras nove estirpes de *D. vulgaris* e de *D. desulfuricans* e que em pelo menos quatro delas os genes estão espacialmente ligados. Uma observação interessante é a de que o gene que codifica para a Dx apenas ter sido encontrado em *D. gigas*, precisamente uma espécie que não contém o gene *rbo*. Este resultado parece apontar para o facto de ser pouco provável que ambas as proteínas coexistam num mesmo organismo.

De seguida é descrito o procedimento de purificação da Desulfoferrodoxina (Dfx) a partir do extrato celular de *D. desulfuricans* ATCC 27774, bem como a caracterização bioquímica e espectroscópica desta proteína.

V.2. Purificação.

O crescimento das células de *D. desulfuricans* ATCC 27774 foi feito num meio semelhante ao descrito por Liu e Peck⁴. O meio usado, bem como toda a metodologia utilizada para a obtenção do extrato celular, são descritos no apêndice A (métodos).

O procedimento experimental pode variar em cada purificação e depende de vários factores, tais como a quantidade total de proteína ou dos meios cromatográficos que se encontrem disponíveis. De seguida é descrita uma purificação típica para a Dfx, na qual são utilizadas, sequencialmente, técnicas de cromatografia clássica bem como cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Caso não seja especificado nada em contrário todos os procedimentos de purificação foram realizados a cerca de 4° C e a pH=7.6.

O primeiro passo foi mantido igual em todas as purificações efectuadas. Neste passo, o extrato celular (sobrenadante obtido, com o volume aproximado de 1500 ml) foi aplicado numa coluna (6 x 32.5 cm) com um enchimento de dietil-amino-etilcelulose (DEAE-52 Whatman) e equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM. Após a aplicação do extrato celular, a coluna foi lavada com o volume de tampão Tris-HCl 10 mM necessário para que as proteínas de maior ponto isoeléctrico (que não se adsorvem a esta resina aniónica) sejam eluídas na totalidade. De seguida foi aplicado um gradiente linear de tampão Tris-HCl de 10 a 500 mM, com um volume total de 6 litros. A primeira fracção a ser eluída (100 a 200 mM) continha, maioritariamente, citocromos. Esta fracção, com um volume aproximado de 1 litro, foi dialisada contra água de modo a baixar a força iónica.

Nesta etapa da purificação, pode surgir uma diferença no procedimento a efectuar. Dependendo do maior, ou menor, conteúdo proteico do extrato celular existe a possibilidade desta primeira coluna de DEAE-52 saturar. Em tal caso é normal que a primeira fracção recolhida durante a lavagem, com Tris-HCl 10 mM, contenha a desulfoferrodoxina. Assim sendo, deve-se dialisar esta fracção para prosseguir a purificação do modo descrito em seguida.

Após ser concentrada num Diaflo equipado com uma membrana YM5, a fracção recolhida da primeira coluna de DEAE-52 foi aplicada numa segunda coluna de DEAE-52

(4 x 30 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM. Aplicou-se, então, um gradiente linear de tampão Tris-HCl entre 10 e 200 mM, com o volume total de 1 litro. Recolheu-se a fracção eluída a 150 mM, procedendo-se à respectiva diálise e concentração (Diaflo, YM5). Esta fracção era maioritariamente constituída por uma proteína de cor castanha e por citocromos. Nesta altura da purificação podemos executar um de dois passos. O uso de um sistema de HPLC equipado com uma coluna de permuta iónica de grande capacidade, ou um sistema semelhante, permitirá um melhor rendimento bem como maior rapidez na obtenção das fracções seguintes. Alternativamente, pode-se efectuar uma cromatografia clássica usando uma coluna com um enchimento de hidroxilapatite (HTP). De seguida descreve-se a primeira destas alternativas.

A fracção foi aplicada num sistema de HPLC equipado com uma coluna C16/70 com um enchimento de Q-sepharose fast flow (Pharmacia), e usou-se um gradiente linear de tampão Tris-HCl (pH=7.0) entre 10 e 250 mM com um caudal de 4 ml/min durante 120 minutos. Para além de diversas fracções citocrómicas e de uma proteína de ferro e enxofre, obtiveram-se dois picos, um de cor acinzentada (1ª fracção, eluída a 100 mM) e outro de cor rosada (2ª fracção, eluída a 125 mM). Os dois picos apresentavam espectros de visível semelhantes (ver secção de UV-visível). A pureza das fracções pode ser estimada usando a razão entre as absorvâncias aos comprimentos de onda específicos do cromóforo da proteína (neste caso 495 nm) e da proteína (usualmente 280 nm, pois é aproximadamente o comprimento de onda ao qual os resíduos aromáticos têm máximos de absorção). Estas duas fracções apresentavam as razões A_{279}/A_{495} de 8.3 (1ª fracção) e 7.7 (2ª fracção). Cada uma destas fracções, após diálise e concentração (Diaflo, YM5) foi aplicada num sistema de HPLC equipado com uma coluna DEAE TSK 5PW (Waters). Usou-se um gradiente linear de tampão Tris-HCl (pH=7.0) entre 10 e 150 mM com o caudal de 3 ml/min durante 120 minutos. Obtiveram-se então duas fracções. Uma da proteína cor-de-rosa com uma razão A_{279}/A_{495} de 5.5 e outra da proteína cinzenta com uma razão A_{279}/A_{495} de 5.7.

Se no segundo passo da purificação tivéssemos optado por usar a cromatografia com HTP dever-se-ia ter procedido do seguinte modo. Aplicar-se-ia a fracção numa coluna de HTP (2.5 x 15 cm) equilibrada com Tris-HCl 150 mM (250 ml). De seguida aplicar-se-ia,

sequencialmente, um gradiente linear descendente de Tris-HCl de 150 a 10 mM (com o volume total de 500 ml) seguido de um gradiente ascendente de tampão fosfato de potássio entre 1 e 200 mM (com um volume total de 1 litro). Fracções eluídas entre 25 e 50 mM contêm uma mistura das duas formas com uma razão A_{279}/A_{495} aproximadamente igual a 16. O próximo passo da purificação seria a utilização de um sistema de HPLC equipado com uma coluna DEAE TSK 5PW (nas condições atrás referidas), permitindo a obtenção de duas fracções constituídas maioritariamente por proteína cor-de-rosa e cinzenta com razões aproximadamente iguais às anteriormente indicadas.

Como poderemos ver de seguida, os dois picos de proteína (cor-de-rosa e cinzenta) obtidos, correspondem a uma única proteína, a desulfoferrodoxina, em dois diferentes estados de oxidação (nas secções seguintes estes dois estados de oxidação serão referidos como forma cinzenta e forma rosa). Como tal, após algum tempo, as amostras tendem a permanecer como uma mistura das duas formas (mesmo mantendo as amostras a -80°C). Para voltar a separar as duas formas apenas é preciso repetir o último passo da purificação. Alternativamente, para quantidades menores de proteína, pode-se usar um sistema de HPLC equipado com uma coluna MonoQ HR10/10 (Pharmacia) e um gradiente linear de tampão Tris-HCl (pH=7.0), entre 10 e 150 mM com um caudal de 1.5 ml/min durante 50 minutos.

O grau de pureza, e homogeneidade, das fracções finais foi também verificado por electroforese em gel de poliacrilamida (12.5%) na presença de 1% de dodecilsulfato de sódio (SDS).

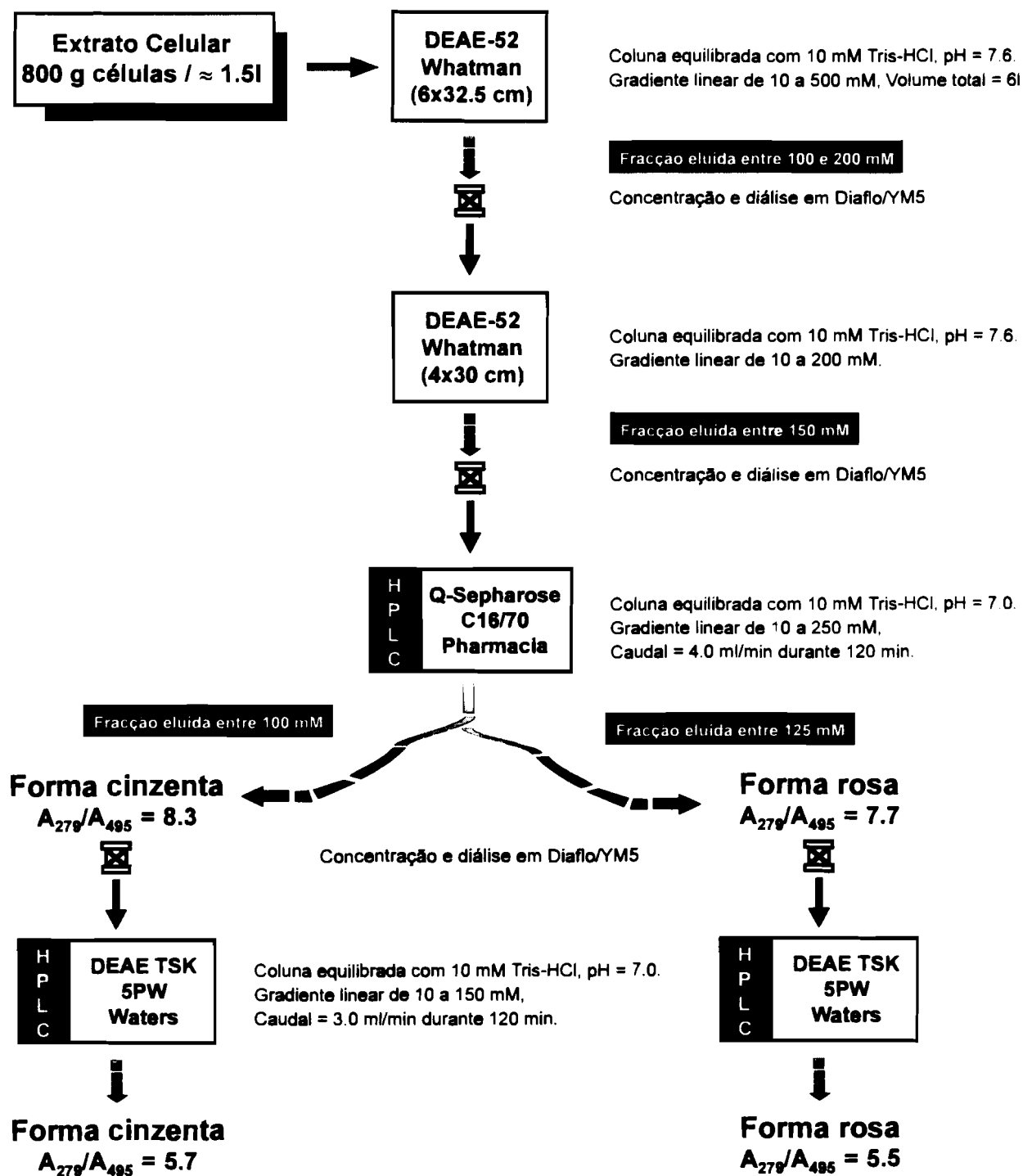


Figura VI.1 - Esquema de purificação da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

V.3. Determinação da massa molecular.

Foram usadas três técnicas diferentes para a obtenção da massa molecular da desulfoferrodoxina. O uso de cromatografia de exclusão molecular (usando uma coluna de filtração em gel Sephadex G-25, Pharmacia) revelou a existência de apenas um pico com o peso molecular de 14 kDa. A confirmação desta massa molecular veio da aplicação da técnica de espectrometria de massa, de onde foi obtido o resultado de 13883.98 ± 1.53 Da. A determinação baseada na técnica de electroforese em gel de poliacrilamida na presença de 1% de SDS (SDS-PAGE), de acordo com o método de Lamelli⁵ (ver apêndice A - Métodos), revela a presença de duas bandas com as massas moleculares de 14 e 16 kDa (ver figura VI.2). A quantidade relativa destas bandas é dependente da percentagem de β -mercaptoetanol usada na amostra.

Uma explicação possível para a observação das duas bandas com diferentes massas moleculares aparentes é a existência de pontes dissulfureto na proteína. A migração num gel de SDS-PAGE é apenas dependente da massa molecular das proteínas. Isto, se assumirmos que após a agregação com o SDS todas as moléculas têm a mesma forma de bastonete, que a taxa de agregação é aproximadamente igual para todas as proteínas e que a carga interna da proteína é desprezável face à carga do agregado SDS-proteína. No entanto a existência de pontes dissulfureto pode influenciar a migração pois os dois primeiros pressupostos referidos podem deixar de ser válidos. Neste caso particular, a proteína contém apenas 6 cisteínas (ver resultados da análise de ácidos aminados). Existe assim a possibilidade de se estabelecer uma ponte de dissulfureto na proteína. A redução desta ponte, por adição do β -mercaptoetanol, deve implicar uma mudança conformacional tal que a taxa de associação SDS:proteína é mais baixa que o normal. Assim sendo, a proteína migra menos pois a força electromotriz é menor.

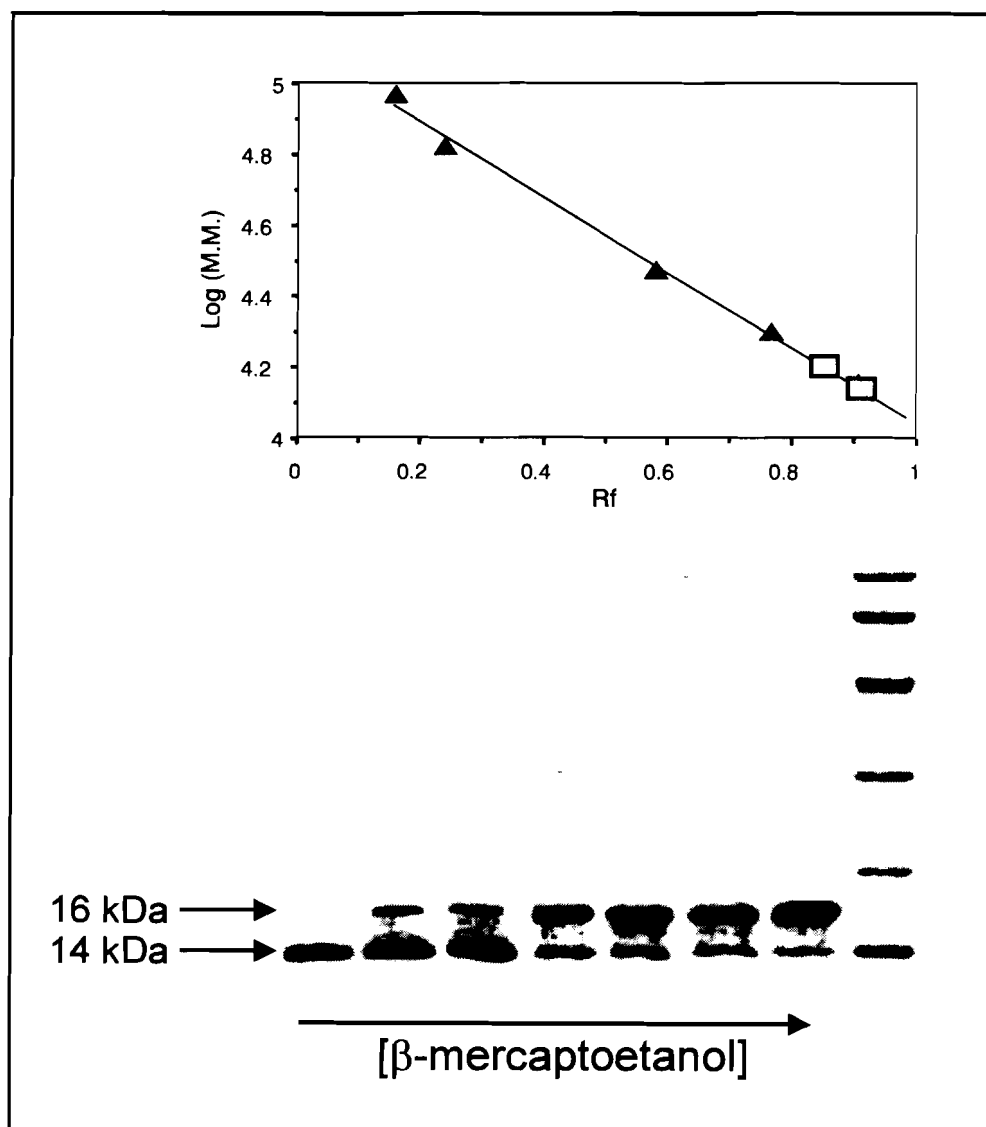


Figura VI.2 - Comportamento das amostras de desulfoferrodoxina num gel de poliacrilamida (12.5%) na presença de 1% de SDS. A seta ao longo do gel indica o sentido no uso de quantidades crescentes de β -mercaptoetanol no tampão de incubação da amostra.

V.4. Determinação do conteúdo em ferros.

Para se proceder à determinação do conteúdo em ferro utilizou-se a espectroscopia de emissão por plasma, bem como métodos químicos (usando 2,4,6-tripiridil-s-triazina⁶). A determinação da proteína foi feita pelo método de Lowry⁷ e por análise de ácidos aminados (ver apêndice A - Métodos). As determinações foram efectuadas em amostras da forma cinzenta e da forma rosa. Os resultados obtidos estão registados na tabela VI.1 e indicam que ambas as formas possuem dois átomos de ferro por molécula. Resultados análogos foram obtidos para amostras de desulfoferrodoxina purificadas a partir de crescimentos em ⁵⁷Fe.

Table VI.1

Valores obtidos para a determinação do conteúdo em ferro da desulfoferrodoxina.

	Método para determinação da proteína	
	Lowry	Análise de ácidos aminados
Forma rosa	1.97 ± 0.20	1.90 ± 0.10
Forma cinzenta	2.10 ± 0.20	2.22 ± 0.10

VI.5. Determinação da composição em ácidos aminados.

A composição de ácidos aminados foi determinada por hidrólise ácida seguindo o método de Moore e Stein⁸ (ver apêndice A - Métodos). De modo a obter uma quantificação correcta para os resíduos de cisteínas foi utilizado o método da oxidação perfórmica. Na tabela VI.2 apresentam-se os resultados (calculados com base numa massa molecular de 14 kDa). As composições de ácidos aminados revelaram-se iguais para a forma rosa e para a forma cinzenta.

Tabela VI.2

*Composição de ácidos aminados da desulfoferrodoxina (D.d.27774).
Comparação com a composição obtida para o produto do gene Rbo de
D. vulgaris estirpe Hildenborough (D.v.Rbo)*

Ácido aminado	D.d. 27774	D.v.Rbo [⊙]
Asp + Asn	10	9
Tre	5	3
Ser	4	3
Glu + Gln	15	15
Gli	13	12
Ala	10	11
Cis	6	6
Val	12	12
Met	3	3
Ile	6	7
Leu	10	6
Tir	1	5
Fen	3	2
His	7	7
Lis	11	14
Arg	2	1
Pro	7	6
Trp	ND	3
Total de ácidos aminados	125	125
Peso molecular	14109	14569

ND - Não determinado.

⊙ - Valores derivados da sequência (referência 2).

VI.6. Determinação do N-terminal e sequência parcial.

A determinação do N-terminal da desulfoferrodoxina foi feita através da degradação de Edman, usando um sequenciador automático, Applied Biosystem 477A, acoplado a um analisador, Applied Biosystem 120A. Foram sequenciados 41 ácidos aminados, não sendo detectada qualquer diferença entre a forma rosa e a forma cinzenta. Na tentativa de obtenção de péptidos para efectuar a sequenciação da desulfoferrodoxina procedeu-se ao corte com brometo de cianogénio (BrCN). Escolheu-se este reagente por análise da sequência da proteína homóloga (o produto do gene *rbo*) de *D. vulgaris* (estirpe Hildenborough). O BrCN corta a ligação peptídica entre um resíduo de metionina e outro qualquer ácido aminado (Met-x). Como é possível verificar na tabela VI.2 existem três metioninas na composição de ácidos aminados da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Assim será de esperar a presença de quatro péptidos após a reacção com o BrCN. Por comparação com o produto do gene *rbo*, e assumindo que as metioninas são conservadas, obter-se-iam os péptidos descritos na tabela VI.3.

Tabela VI.3

Péptidos resultantes da análise feita por computador (PCGENE)

*dum hipotético corte com BrCN do produto do gene **rbo** (*D. vulgaris*)*

Péptido	Posição na sequência	Número de ácidos aminados	Massa molecular (Da)
1	Pro-1 a Met-33	33	3563
2	Lys-34 a Met-36	3	391
3	Lys-37a Met-70	34	3566
4	Glu-71 a Ala-125	55	6386

Fez-se reagir a Dfx com um grande excesso de BrCN em meio ácido. Para tal preparou-se uma solução com aproximadamente 1 mg de proteína que se secou sob um fluxo de azoto, sendo posteriormente redissolvida em 200 µl de ácido fórmico 85%. A esta solução adicionou-se 66.1 mg de BrCN e o volume foi ajustado a 500 µl com ácido fórmico 85%. A mistura foi deixada a reagir, numa atmosfera saturada de argon, durante a noite e posteriormente seca sobre vácuo num Speed-vac (Savant). O liofilizado foi ressuspendido em 200 µl de 0.1% TFA e injectada (50 µl) num sistema de HPLC (Gold System, Beckman) equipado com uma coluna de fase reversa RP18 (LKB). Aplicou-se, então, um gradiente linear com o seguinte perfil:

Tempo (minutos)	Acetonitrilo em 0.1% TFA (%)
0	0
15	25
80	50
85	70
90	70

Esta operação foi repetida quatro vezes até a totalidade da amostra ter sido injectada.

Obtiveram-se diversos picos com absorvâncias entre 0.25 e 0.75 U.A. (medidas efectuadas a 220 nm). Nove péptidos foram sequenciados usando o sequenciador/analizador atrás referido. A sequência assim obtida está representada na figura VI.3, bem como os péptidos sequenciados.

O facto de se ter obtido um maior número de péptidos do que o teoricamente esperado terá ficado a dever-se à hidrólise da proteína, pois a reacção foi feita em meio ácido durante um periodo de tempo prolongado.

A figura VI.3 contém um alinhamento entre a sequência obtida para a desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774, a sequência do produto do gene *rbo* e a sequência da Dx de *D. gigas*. A comparação entre a sequência entre as duas primeiras sequências revela que, dos 117 ácidos aminados, 85 são conservados nas mesmas posições (71.4% de identidade). Se utilizarmos o método computacional descrito no capítulo anterior para analisar estas sequências, veremos que a homologia é ainda superior. Nessa análise foi obtida uma pontuação de 463 (sendo a pontuação para uma total identidade igual a 611). Esta semelhança indica que o gene *rbo* codifica para a proteína homóloga à Dfx em *D. vulgaris*.

Por sua vez, da comparação dos primeiros 36 ácidos aminados da Dfx com a sequência da Dx de *D. gigas*, pode-se verificar que existem 17 ácidos aminados, entre a Val-6 e a Met-33, idênticos.

Um resultado significativo é o facto de nestas sequências as posições das quatro primeiras cisteínas (Cis-9, Cis-12, Cis-28 e Cis-29) serem totalmente coincidentes. Este mesmo conjunto de cisteínas foi proposto⁹ como pertencentes à esfera de coordenação do ferro nos centros do tipo Dx.

Figura VI.3 - Sequência parcial da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (*D.d*). Comparação com a sequência do produto do gene *rbo* (*D.v.*) e com a a sequência da desulforedoxina de *D. gigas* (*Dx*). Para as duas primeiras sequências apresentam-se com fundo preto ácidos aminados idênticos e com fundo cinzento as substituições prováveis (segundo a matriz de substituição PAM250). Em baixo das sequências apresentam-se os péptidos obtidos por corte com BrCN (PA1 a PA7) e com a endoproteínase V8 de *Staphilococcus aureus* (PB1 a PB9). As massas moleculares obtidas por espectrometria de massa são referidas entre parêntesis. O corte da desulfoferrodoxina com a endoproteínase V8 foi efectuado no laboratório do Prof. Van Beeumen (Jorge Lampreia & Bart Devreese). Esta endoproteínase efectua cortes na cadeia polipeptídica na parte C terminal do ácido glutâmico (exceptuando as situações em que o ácido glutâmico se encontra antes de uma prolina). A metodologia usada no corte foi a seguinte: a proteína foi incubada com a proteínase V8 (3 h a 37 °C, em tampão de bicarbonato de amónio a pH = 8, 0.1 M). Os péptidos foram separados num HPLC (Applied Biosystem) equipado com uma coluna de fase reversa RP18 e com um detector "diode array" e um "split" para um espectrómetro "electrospray" (Fisions VG).

1 5 10 15

D.d. Pro Lis His Leu Glu Val Tir Lis Cis Tre His Cis Gli Asn Ile
D.v. Pro Asn Gln Tir Glu Ile Tir Lis Cis Ile His Cis Gli Asn Ile
Dx Ala Asn Glu Gli Asp Val Tir Lis Cis Glu Leu Cis Gli Gln Val

N-terminal
PA1
PA2
PB1 (623.35)
PB2 (1363.11)

20 25 30

D.d. Val Glu Val Leu His Gli Gli Gli Ala Glu X Val Cis Cis Gli
D.v. Val Glu Val Leu His Ala Gli Gli Gli Asp Leu Val Cis Cis Gli
Dx Val Lis Val Leu Glu Glu Gli Gli Gli Tre Leu Val Cis Cis Gli

N-terminal
PA1 (3472.33)
PB2
PB3 (739.37)

35 40 45

D.d. Glu Pro Met Lis X Met Val Glu Gli Ser Tre X X X Met
D.v. Glu Pro Met Lis Leu Met Lis Glu Gli Tre Ser Asp Gli Ala Lis
Dx Glu Asp Met Val Lis Gln

N-terminal
PA1

50 55 60

D.d. Glu Lis His Val Pro Val Ile Glu Lis Val Asp Gli Gli Tir Leu
D.v. Glu Lis His Val Pro Val Ile Glu Lis Tre Ala Asn Gli Tir Lis

PA3
PB4 (820.68)
PB5

65 70 75

D.d. Ile Lis Val Gli Leu Val Pro His Pro Met Glu Glu Lis His Trp
D.v. Val Tre Val Gli Ser Val Ala His Pro Met Glu Glu Lis His Trp

PA3
PB5 (2081.11)
PB6
PA4

80 85 90

D.d. Ile Glu Trp Ile Glu Leu Leu Val Ala Asp Gli Arg Ser Tir Tre
D.v. Ile Glu Trp Ile Glu — Leu Val Ala Asp Gli Val Ser Tir Lis

PB5
PA4
PA5
PB7

95 100

D.d. Lis Fen Leu — Pro Gli Asp Ala Pro Glu Ala Fen Fen Ala Ile
D.v. Lis Fen Leu Lis Pro Gli Asp Ala Pro Glu Ala Glu Fen Cis Ile

PA4
PA5
PB7
PB8
PA6

105 110 115

D.d. Asp Ala Ser Lis Val Tre Ala Arg Glu Tir Cis Asn Leu His —
D.v. Lis Ala Asp Lis Val Val Ala Arg Glu Tir Cis Asn Leu His Gli

PB8 (1525)
PA6
PA7
PB9

120 125

D.d. — — — — —
D.v. His Trp Lis Ala Glu Ala

V.7. Estudos espectroscópicos.

V.7.1. Espectroscopia de UV-visível.

O espectro de UV-visível da desulfoferrodoxina está representado na fig VI.4. O espectro da forma rosa (fig VI.4B) apresenta máximos a 495, 368 e 279 nm. Este espectro possui grande semelhança ao espectro da desulforedoxina de *D. gigas*. O espectro da forma cinzenta (fig VI.4A) tem contribuições extras a 335 e 635 nm.

O coeficiente de extinção molar medido a 495 nm (ϵ_{495} calculado para o espectro da forma rosa) tem o valor de $4980 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Este valor é bastante semelhante ao valor obtido para o centro Dx, o que nos indica a provável presença dum centro deste tipo na Dfx (presença comprovada pelos dados de sequenciação e pelas técnicas de espectroscopia de RPE e espectroscopia de Mössbauer como poderemos ver nas secções seguintes). Tendo em conta que para a determinação de ferros se obteve o valor de 2 ferros/molecula, o valor deste coeficiente de extinção molar revela que o outro ferro não é do tipo Dx, pois caso fosse o ϵ_{495} teria de ter um valor correspondente ao dobro do observado.

Tabela VI.4

Valores estimados para o coeficiente de extinção molar (ϵ) a diversos comprimentos de onda (λ)

λ (nm)	ϵ (nm)	Observação
335	4295	Calculado no espectro da diferença (ver figura VI.4)
368	8470	Calculado no espectro da forma rosa
495	4980	Calculado no espectro da forma rosa
635	1870	Calculado no espectro da diferença (ver figura VI.4)

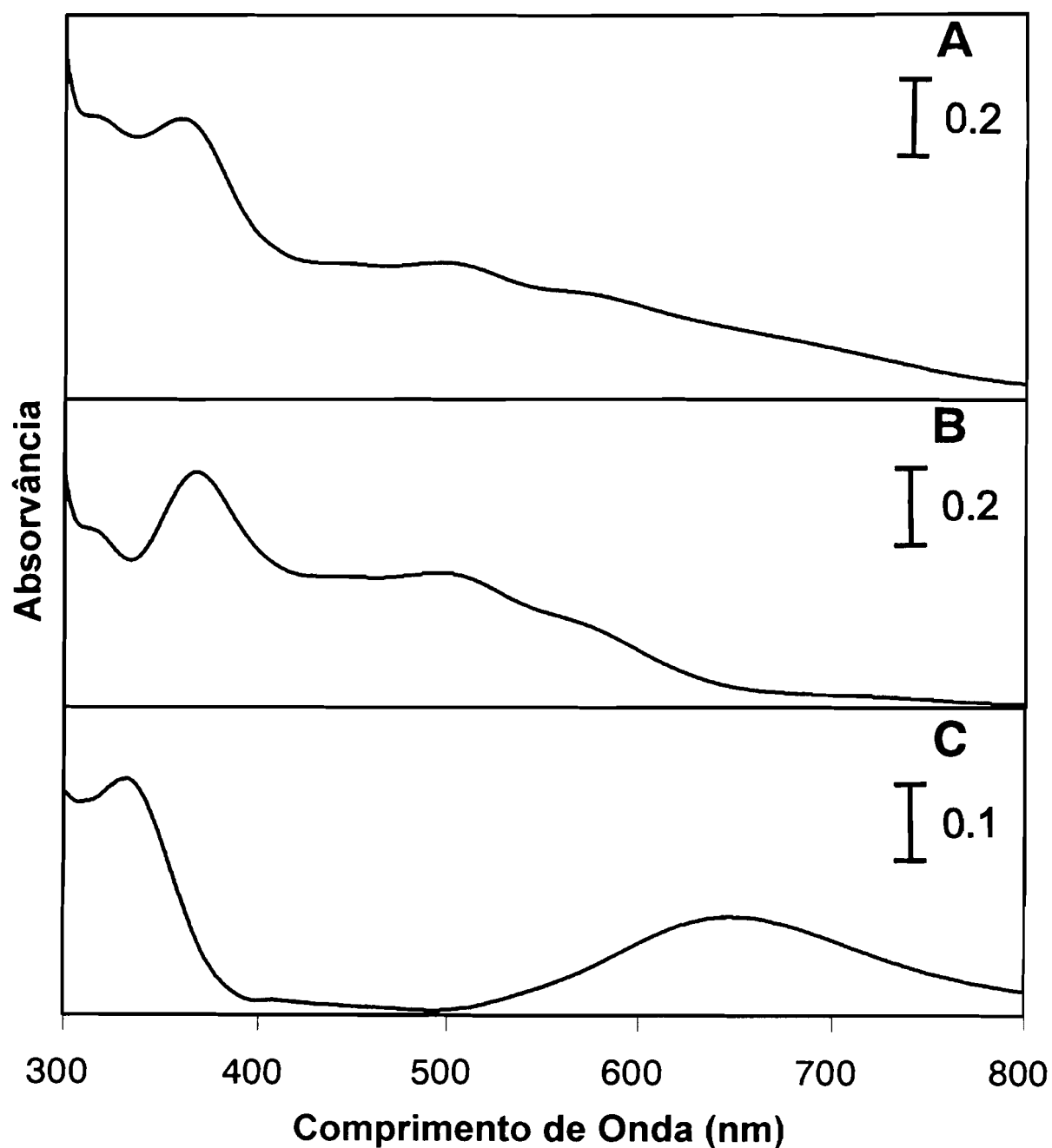


Figura VI.4 - Espectro de visível da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 na forma cinzenta (A) e na forma rosa (B). O espectro C, representa a diferença entre os espectros anteriores (A-B) após normalização a 495 nm.

Após adição de ditionito de sódio quer à forma rosa, quer à forma cinzenta, o espectro de visível perde toda a absorvância revelando que os centros se encontram no estado reduzido. Por adição de ascorbato de sódio (quantidades equimolares) à forma cinzenta obtém-se um espectro de UV-visível idêntico ao da forma rosa. Contrariamente, por adição de quantidades equimolares de ferricianeto de potássio à forma rosa (nativa ou reduzida com ascorbato de sódio) obtém-se um espectro idêntico ao da forma cinzenta.

A figura VI.5 mostra o resultado da titulação da forma rosa com ferricianeto de potássio. A absorvância foi seguida a 635 nm (comprimento de onda característico do centro II). Observa-se um aumento da absorvância a este comprimento de onda aproximadamente até ao ponto da titulação no qual se adicionou um equivalente de ferricianeto. A partir deste valor a adição de ferricianeto não produz um aumento substancial da absorvância.

Estas observações indicam-nos que na forma rosa apenas o centro do tipo Dx está oxidado (o ferro está no estado férrico), contribuindo portanto para o espectro de visível. Na forma cinzenta ambos os centros estão oxidados e portanto ambos contribuem para o espectro de UV-visível. Por subtracção do espectro da forma rosa ao espectro da forma cinzenta obtemos o espectro característico do segundo centro (por uma questão de simplificação nas secções seguintes este centro passará a ser denominado de centro II), como se pode ver na fig. VI.4c.

Como método de determinação dos potenciais de oxidação-redução dos centros metálicos usou-se a espectroscopia de UV-visível acoplada à titulação potenciométrica por meios químicos. Esta técnica apresenta algumas vantagens. Comparativamente à espectroscopia de RPE são necessárias quantidades mais pequenas de proteína. Outra vantagem advém das características espectroscópicas da Dfx. Como se pode ver na fig. VI.4, existem dois comprimentos de onda aos quais a contribuição para a absorvância é mínima para um centro e máxima para o outro. Assim, a 495 nm a contribuição pertence quase exclusivamente ao centro do tipo Dx (81%). Já a 635 nm a contribuição do centro II para a absorvância é de aproximadamente 83%. Tendo estes factos em conta, realizou-se uma

titulação redox (ver apêndice A - Métodos - para obter as condições experimentais) seguindo a evolução da absorvância, aos dois comprimentos de onda referidos, com a variação de potencial.

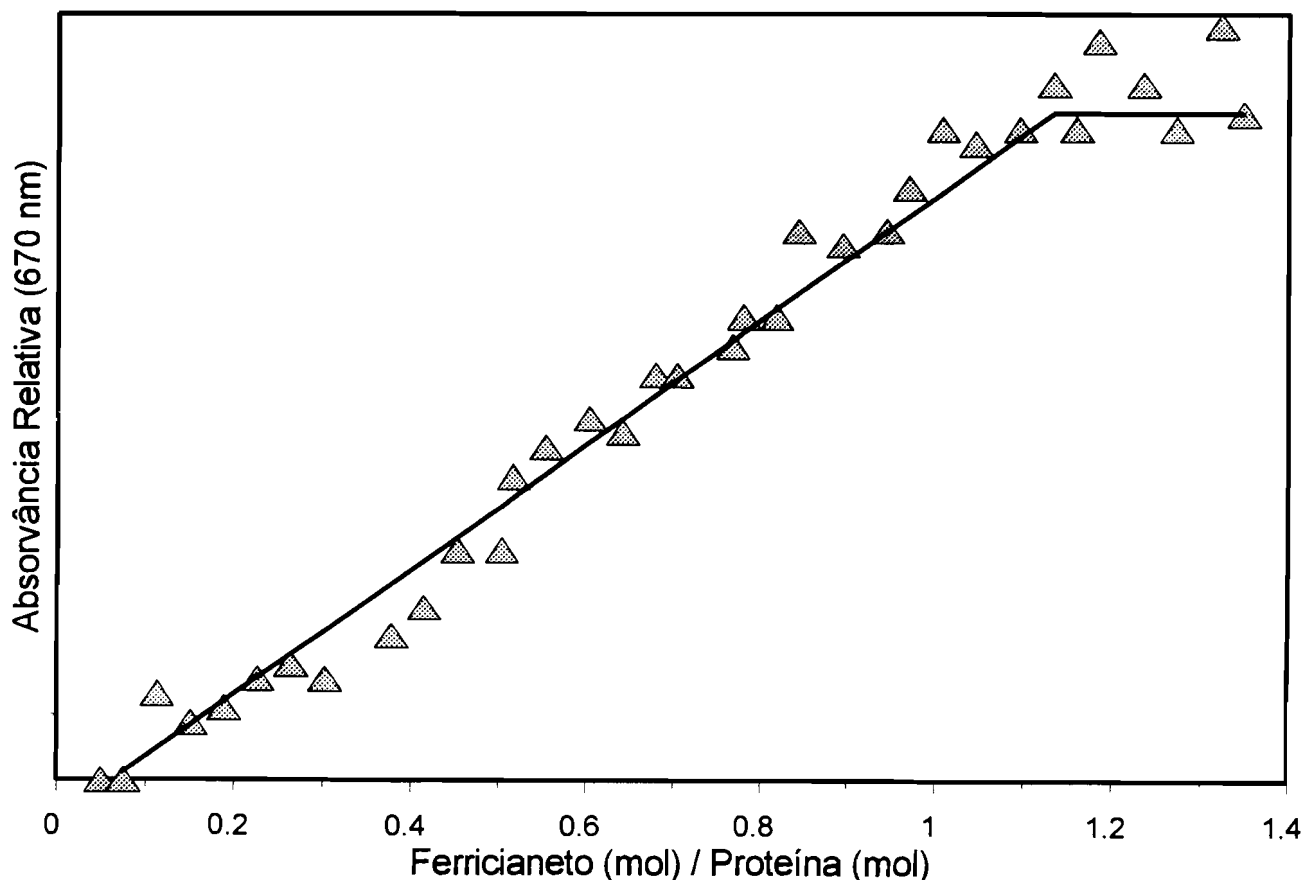


Figura VI.5 - Titulação da forma rosa da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 com ferricianeto de potássio (variação da absorvância a 670 nm com a adição de quantidades subequimolares de ferricianeto de potássio).

As curvas de absorvância versus potencial foram simuladas usando um modelo baseado na equação de Nernst. Os resultados experimentais podem ser reproduzidos por duas equações de Nernst independentes. Na figura VI.6 encontra-se explicado o modelo, e as equações usadas. A espécie p_0 corresponde à forma cinzenta. Por redução monoelectrónica esta espécie pode dar origem às espécies p_1 ou p_2 .

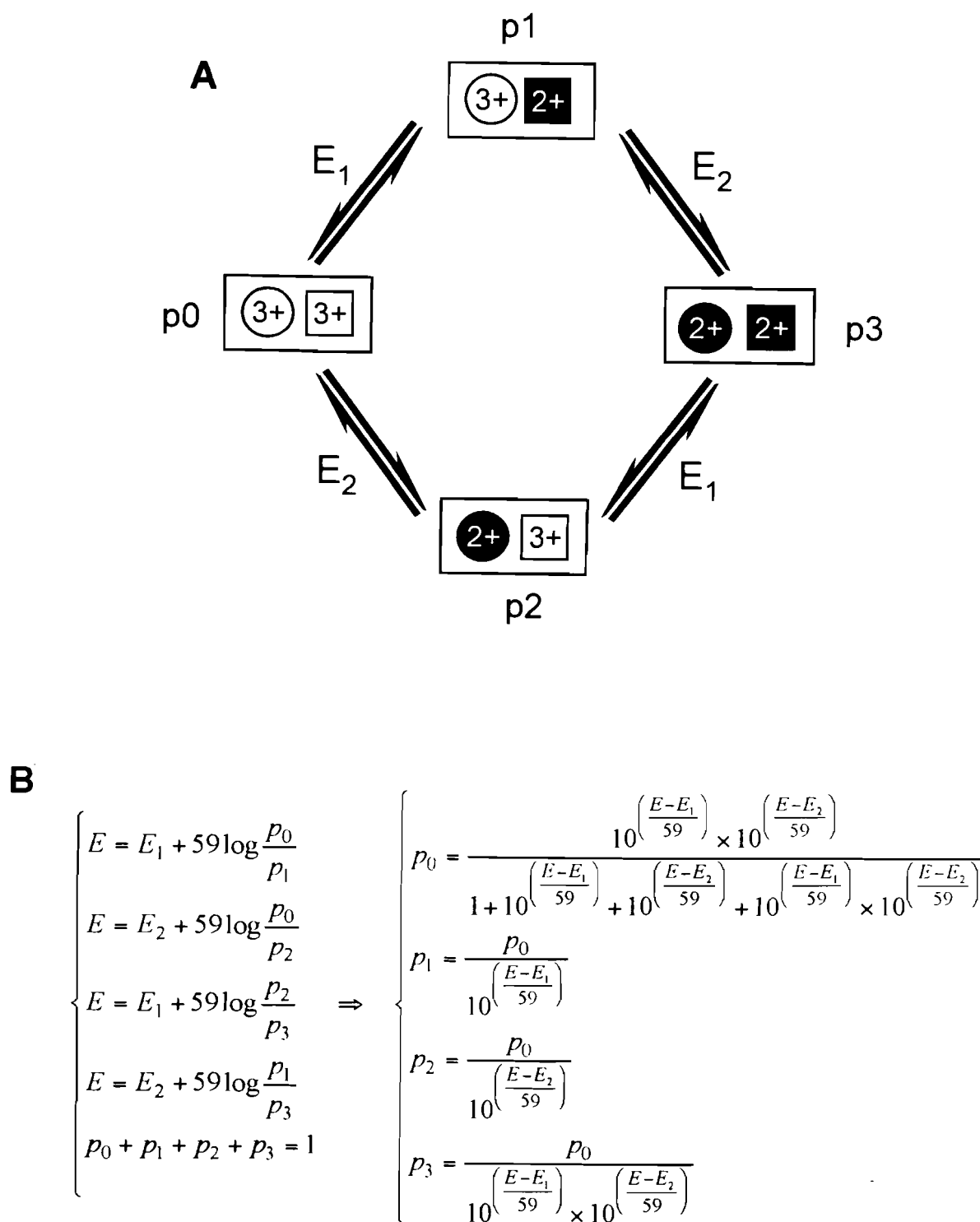


Figura VI.6 - Modelo usado para simular os dados provenientes da titulação potenciométrica (A) e conjunto de equações obtidas para este modelo (B).

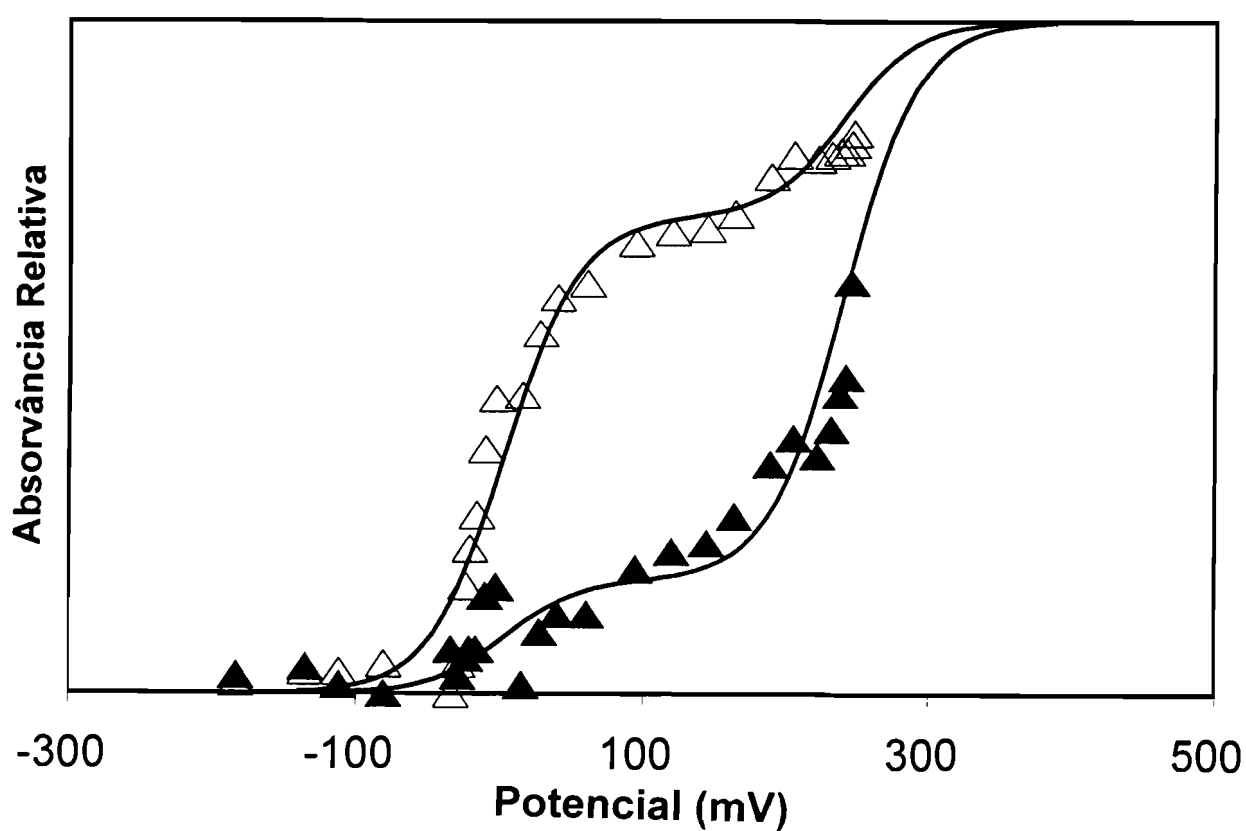


Figura VI.7 - Curvas obtidas para a titulação potenciométrica da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774. A variação da absorvância foi seguida a 495 nm (Δ) e a 635 nm (\blacktriangle). As linhas a cheio representam a simulação das curvas usando as equações descritas na figura VI.6B, com $E_1 = 240$ mV e $E_2 = 4$ mV.

Como veremos de seguida, a diferença de potenciais de oxidação-redução dos dois centros é maior do que 200 mV. Este facto implica que a espécie que está presente maioritariamente em solução (aproximadamente 100%) seja p_1 , isto é a espécie correspondente à forma rosa. Após nova redução obtém-se a espécie p_3 , na qual ambos os centros estão no estado reduzido. Uma outra implicação do facto da diferença de potenciais de oxidação-redução ser grande é não existir a necessidade de incluir neste modelo um potencial de interacção.

Os resultados (ver figura fig. VI.7) revelam que o centro II tem um potencial redox de 240 ± 10 mV vs NHE. Este resultado explica o facto, pouco comum, de esta proteína poder ser isolada aerobicamente com o centro II no estado reduzido. O potencial do centro do tipo Dx foi calculado como sendo igual a 4 ± 10 mV vs NHE. Este valor é típico de um centro deste tipo. A posterior determinação destes potenciais por meios electroquímicos veio comprovar os valores obtidos.

V.7.2. Espectroscopia de RPE.

Como seria de esperar, o espectro da forma rosa apresenta grandes semelhanças comparativamente com o da Dx de *D. gigas*. Assim, o espectro de RPE da forma rosa (figura VI.8b) apresenta ressonâncias a $g=7.7, 5.7, 4.3, 4.1$ e 1.8 . Este valores são iguais aos obtidos para a Dx (com excepção da ressonância a $g = 4.3$), pois na forma rosa apenas o centro do tipo Dx está oxidado (Fe^{3+}). Estamos, portanto, na presença de um sistema férrico de spin alto, com $S = 5/2$. Para descrever este sistema é possível usar o seguinte Hamiltoniano de spin:

$$\hat{H}_e = D \left[S_z^2 - \frac{S(S+1)}{3} + \left(\frac{E}{D} \right) (S_x^2 - S_y^2) \right] + \beta \vec{S} \cdot \vec{g} \cdot \vec{H}$$

D e E são os parâmetros característicos do desdobramento a campo zero. Se escolhermos o valor de 0.08 para E/D, é possível reproduzir os valores de g (7.7, 5.7, 4.1, e

1.8) obtidos experimentalmente (ver fig VI.9). Assim, teoricamente, pode verificar-se que os valores de g iguais a 7.7 (g_y), 4.1 (g_x) e 1.8 (g_z) correspondem ao dobleto de Kramer de mais baixa energia ($m_s = \pm 1/2$). Por sua vez, o valor de g igual a 5.7 (g_z) provém do segundo dobleto de Kramer ($m_s = \pm 3/2$). Este factos foram comprovados experimentalmente através da evolução da intensidade dos sinais a $g=7.7$ e $g=5.7$ com a variação da temperatura. Na figura VI.10 apresenta-se uma sequência de espectros da forma rosa em função da temperatura. Nesta sequência é possível verificar que a intensidade do sinal a $g=7.7$ decresce com o aumento da temperatura. Este comportamento é indicativo de um sinal proveniente dum estado fundamental pois com o aumento da temperatura os estados excitados vão ser populados à custa do estado fundamental, seguindo uma distribuição de Boltzman. Neste caso a população de um estado é dada pela seguinte equação:

$$X_i = \frac{\exp(-\Delta_i/kT)}{1 + \exp(-\Delta_1/kT) + \exp(-\Delta_2/kT)}$$

Em que X_i é a fracção populacional no estado i ; Δ_i a diferença de energia entre estado i e o estado fundamental (M_s igual a 1/2, pois $D > 0$); Δ_1 e Δ_2 as diferença de energia entre os estados com M_s igual a 3/2 ou 5/2 e o estado fundamental; k a constante de Boltzman e T a temperatura. A diferença de energia entre os níveis foi calculada para $D = 2.2 \text{ cm}^{-1}$ e $E/D = 0.08$, a partir do diagrama de energia em função de E/D (ver figura VI.9).

Como podemos ver na figura VI.11, a fracção de spins no estado fundamental diminui com o aumento de temperatura e, proporcionalmente, os estados excitados vão sendo populados. Da mesma sequência de espectros, é possível verificar que o sinal a $g = 5.7$ aumenta de intensidade indicando, portanto, que provém dum estado excitado como previsto teoricamente.

Teoricamente é possível calcular o valor de D de um dado sistema se conhecermos a intensidade dos sinais de dois diferentes estados de energia. No entanto para que o erro associado a essa determinação seja pequeno é necessário conhecer com rigor a temperatura à qual se efectua a aquisição do espectro de RPE. O desenho do criostato usado não permite

que tal determinação seja efectuada sem erros significativos, porque o erro na determinação da temperatura é normalmente da ordem de grandeza do valor de D . O valor de D é mais correctamente estimado a partir de dados da espectroscopia de Mössbauer cujo espectro adquirido a campos magnéticos elevados apresenta, como veremos na secção seguinte, variações apreciáveis dependentes do valor de D .

A única ressonância por explicar no espectro de RPE da forma rosa é a observada a $g = 4.3$. A origem desta ressonância pode ser compreendida por comparação do espectro com o da forma cinzenta. Assim será possível verificar que esta ressonância provém de uma pequena percentagem do centro II que se encontra no estado oxidado.

O espectro de RPE da forma cinzenta (figura VI.8a) para além dos valores de g acima indicados apresenta um grande aumento de intensidade do sinal a $g = 4.3$ e uma ressonância alargada a $g = 9.6$. Estas novas ressonâncias provêm do centro II, que nesta forma se encontra no estado oxidado. Utilizando o hamiltoniano anteriormente descrito, podem ser caracterizadas como sendo originárias de um ferro férrico de spin alto ($S = 5/2$) com $E/D = 0.28$. Como será possível verificar de seguida, os dados de Mössbauer indicam que estamos na presença de um sistema cujo valor de D é negativo. Neste caso, o diagrama de valores de g em função de E/D é o inverso ao apresentado na figura VI.9, pois o dobleto de Kramer de mais baixa energia corresponde ao nível com $m_s = \pm 5/2$ e o de maior energia corresponde ao nível com $m_s = \pm 1/2$. Os valores de g obtidos para um tal diagrama estão referenciados na tabela VI.5. Da tabela é também possível concluir que a ressonância a 4.3 é originária do dobleto de kramer com $m_s = \pm 3/2$.

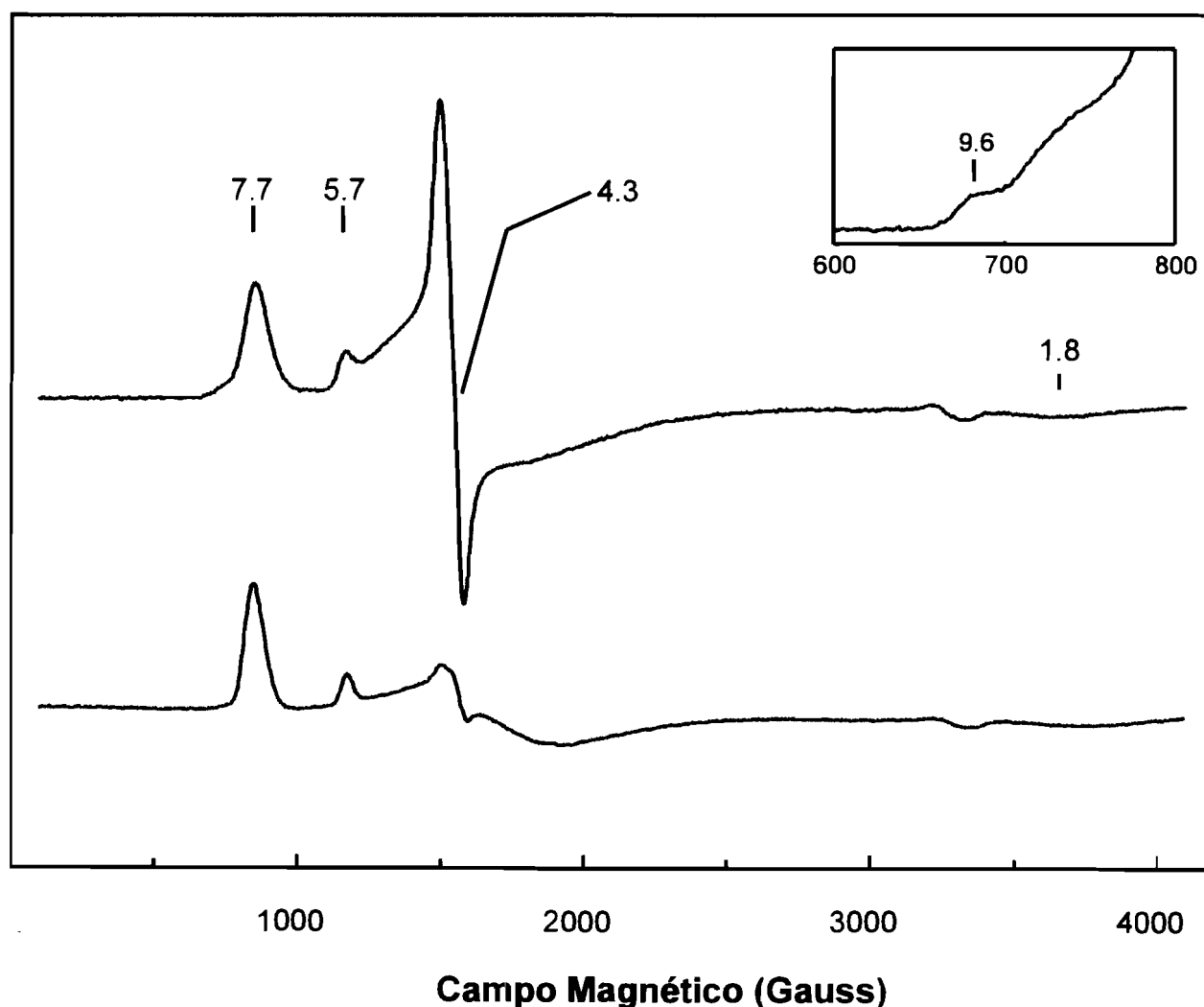


Figura VI.8 - Espectros de RPE da forma cinzenta (A) e da forma rosa (B) da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Condições experimentais: temperatura 4.4 (A) e 4.3 (B) K; frequência da micro-onda igual a 9.432 (A) e 9.453 (B) GHz; potência da micro-onda igual a 200 (A) e 234 (B) μ W, amplitude de modulação igual a 1 (A) e 0.5 (B) mT e ganho igual a 2×10^4 . No canto superior direito encontra-se evidenciada a ressonância a $g = 9.6$ da forma cinzenta. Neste caso as condições experimentais nas quais foi obtido o espectro foram as seguintes: temperatura 4.4 K; frequência da micro-onda igual a 9.432 GHz; potência da micro-onda igual a 20 mW, amplitude de modulação igual a 1 mT e ganho igual a 1.25×10^5 .

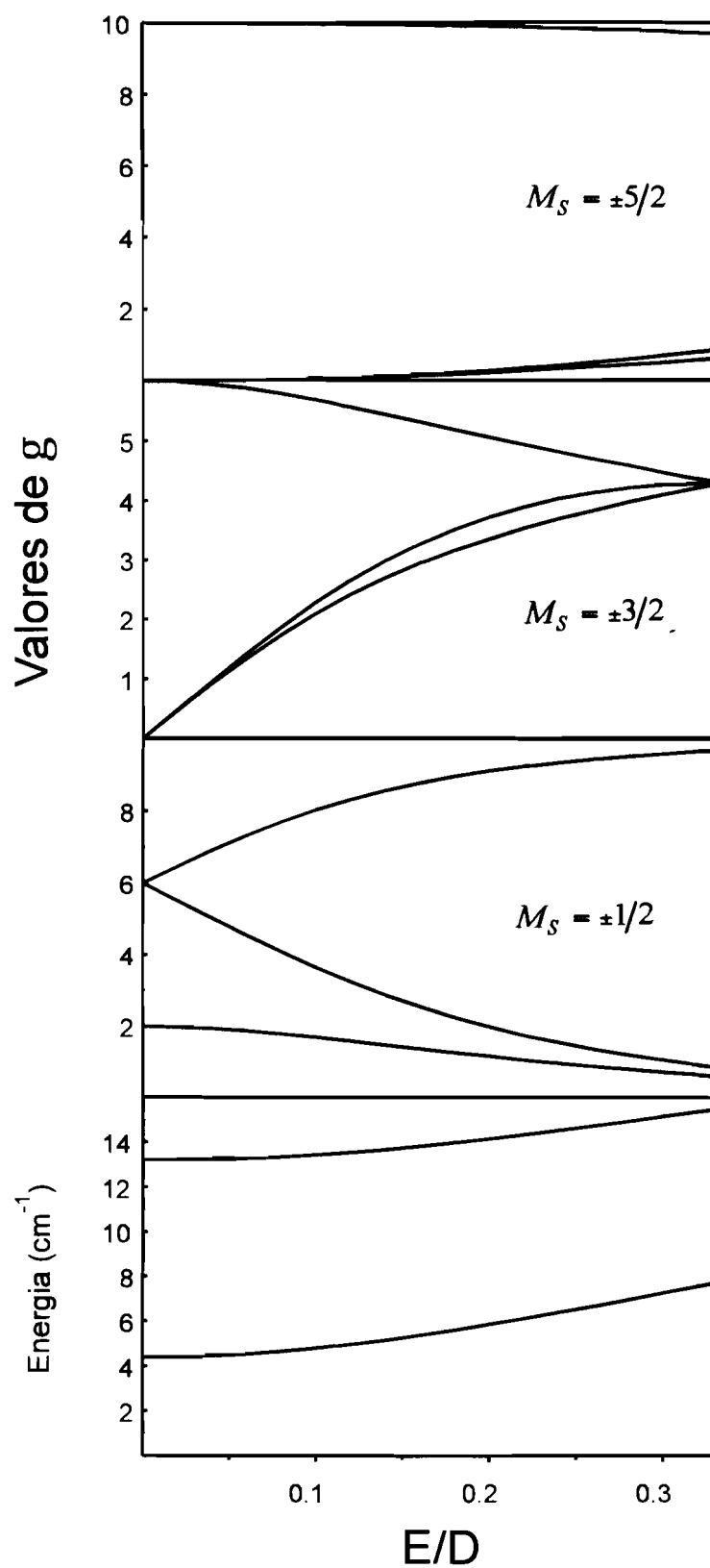
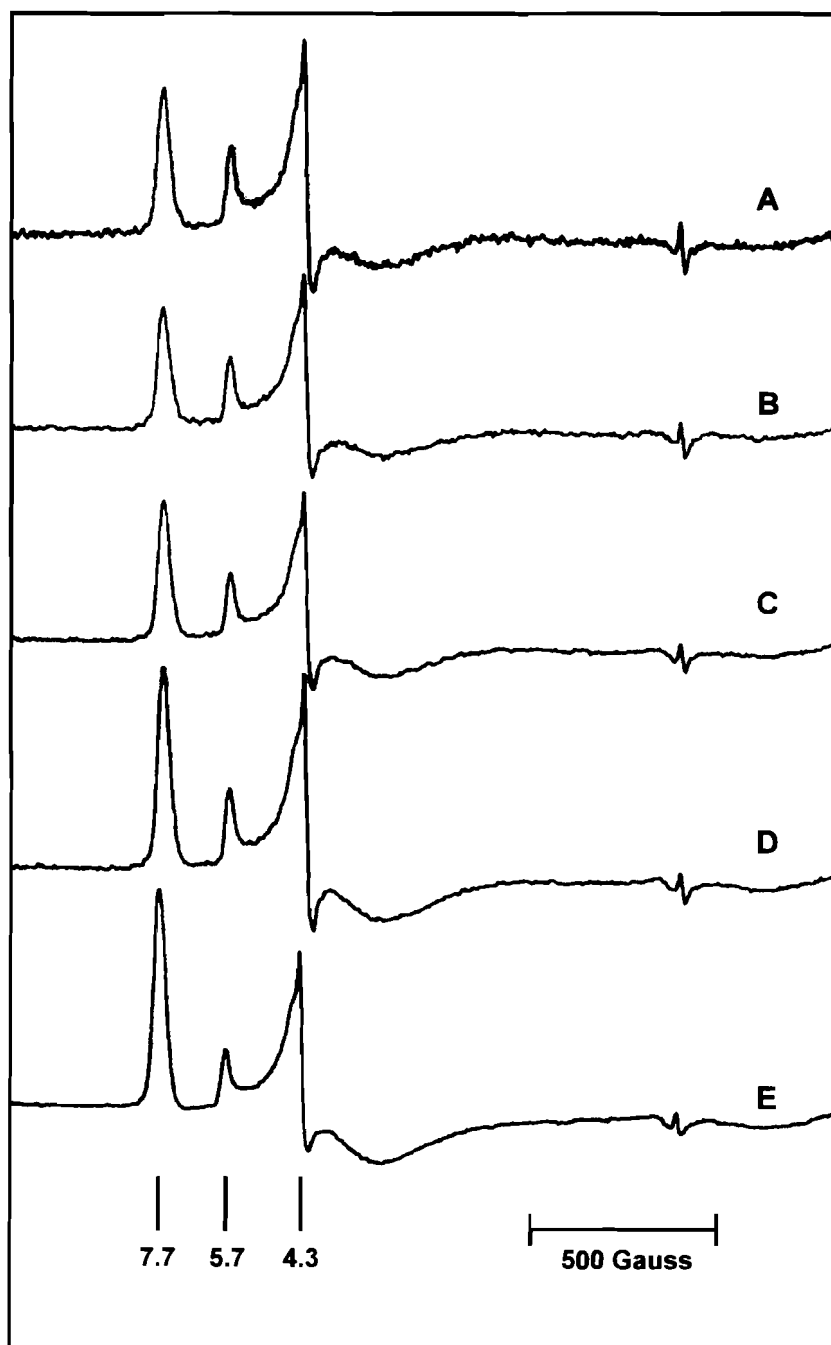


Figura VI.9 - Diagrama de valores de g em função da rombicidade (E/D) de um sistema com $S = 5/2$. Os valores de energia foram calculados para $D = 2,2 \text{ cm}^{-1}$.



Campo Magnético (Gauss)

Figura VI.10 - Espectros de RPE da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774 a diferentes temperaturas: A, 24.0 K; B, 16.4 K; C, 10.4 K; D, 7.6 K; E, 4.4 K. Outras condições experimentais: frequência da micro-onda igual a 9.425 GHz; potência da micro-onda igual a 200 μ W, amplitude de modulação igual a 1 mT e ganho igual a 8×10^4 (A); 5×10^4 (B,C); 3.2×10^4 (D); 2×10^4 (E).

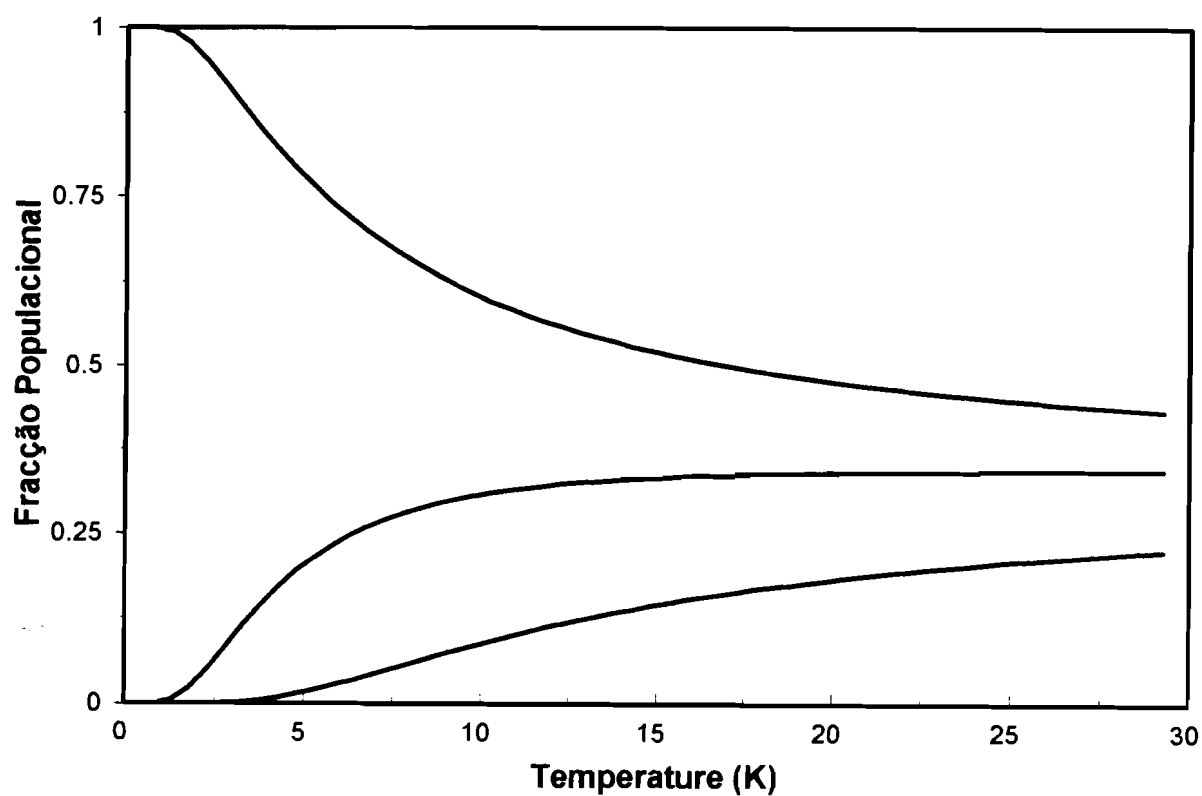


Figura VI.11 - Curvas teóricas para a variação da população de cada dobleto de Kramer, de um sistema com $S = 5/2$, com a temperatura. As diferenças energéticas entre os diversos níveis foram calculadas para um sistema com $D = 2.2 \text{ cm}^{-1}$ e $E/D = 0.08$.

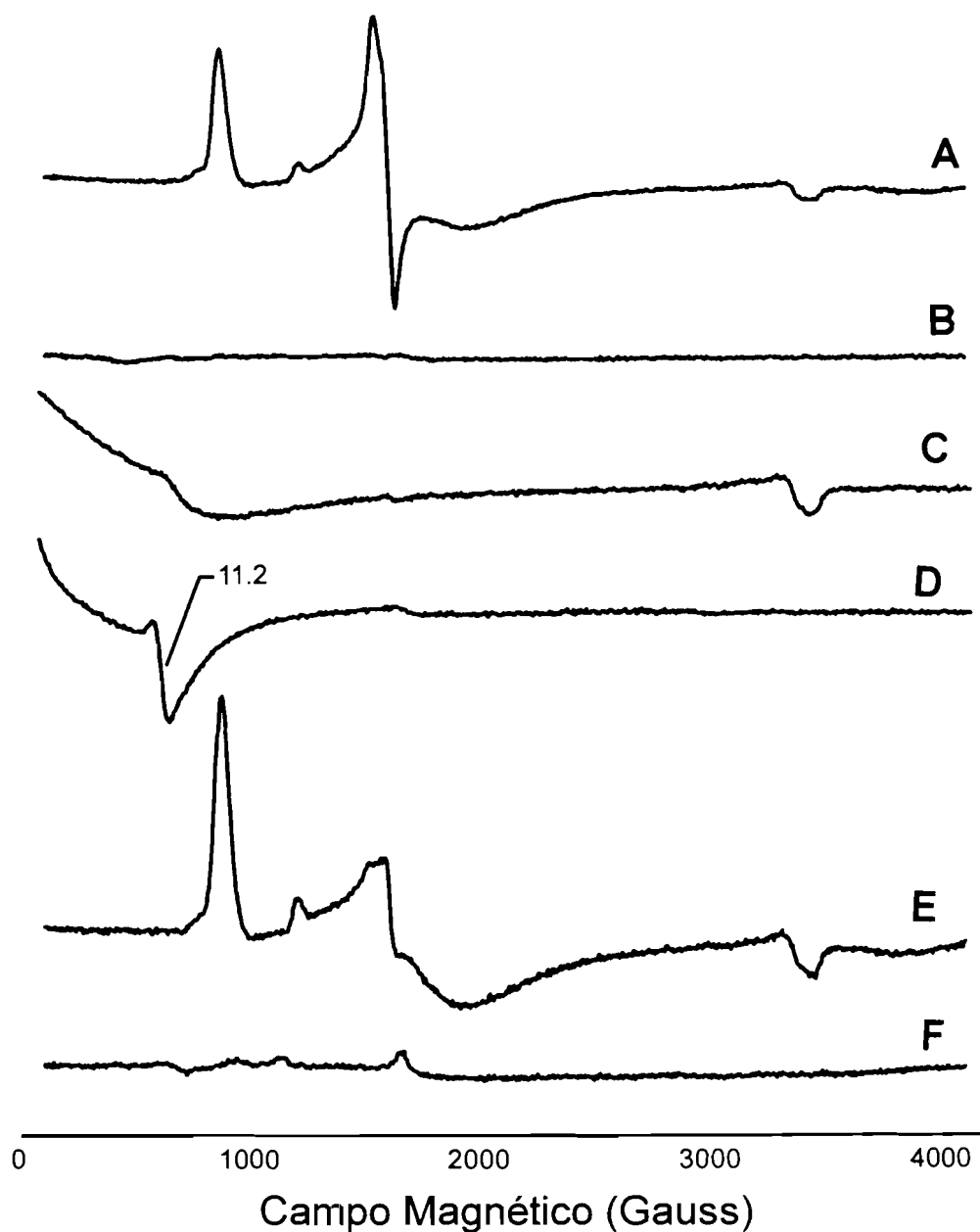


Figura VI.12 - Comparação entre os espectros de RPE da desulfoferrodoxina adquiridos com o campo da micro-onda perpendicular (\perp) e paralelo (\parallel) ao da radiofrequência, em três diferentes estados de oxidação: i) forma nativa (A, \perp) e (B, \parallel); ii) após adição de ditionito de sódio (C, \perp) e (D, \parallel) e iii) após reoxidação ao ar (E, \perp) e (F, \parallel). Condições experimentais: temperatura, 4.4 K; frequência da micro-onda igual a 9.638 (\perp) e 9.367 (\parallel) GHz; potência da micro-onda igual a 78 (A, E) e 2.28×10^3 (B, C, D, F) μ W, amplitude de modulação igual a 0.9 mT e ganho igual a 8×10^3 .

Tabela VI.5

*Valores de g obtidos para um sistema com três doubletos de
Kramer ($S=5/2$), com $D = -1.37 \text{ cm}^{-1}$ e $E/D = 0.28$*

Dobletos (Ms)	Energia (cm^{-1})	g_x	g_y	g_z
5/2	0.00	0.59	0.45	9.79
3/2	4.98	4.21	3.97	4.58
1/2	9.33	1.20	9.52	0.80

O espectro da Dfx na forma totalmente reduzida (redução com ditionito de sódio) contém um sinal de derivada, bastante alargado, centrado a $g \approx 11.2$ (ver figura VI.12c). A aquisição do espectro de RPE com o campo da micro-onda paralelo ao da radiofrequência provoca um aumento de intensidade deste sinal (ver figura VI.12d), facto indicativo de estarmos na presença de um sinal proveniente dum sistema de spin inteiro. Este sinal é típico de sistemas com $S = 2$,¹⁰ e provém do centro do tipo Dx no estado reduzido. Esta conclusão é apoiada pelo facto deste sinal não ser observado na forma rosa (na qual o centro II já se encontra reduzido) como se pode verificar no espectro da figura VI.12f. Conjuntamente com este facto, existem também evidências vindas dos dados da espectroscopia de Mössbauer, onde não se verifica qualquer alteração no espectro do centro II quando se passa da forma rosa ao estado completamente reduzido. Apesar do acima discutido, é importante referir que este sinal nunca foi observado na forma reduzida da desulforedoxina de *D. gigas*. No entanto existem alguns compostos modelo,¹¹ que tentam reproduzir este tipo de centro, para os quais este sinal já foi observado.

A adição de cianeto de potássio provoca uma alteração no espectro de RPE da Dfx. As figura VI.13 e figura VI.14 mostram, respectivamente, a evolução com o tempo de incubação dos espectros de RPE da forma cinzenta e rosa após a adição de cianeto de potássio (1500 vezes em excesso), sob uma atmosfera de argon. Logo após a adição ocorre o

aparecimento de um sinal rômbo com valores de g iguais a 2.54, 2.38 e 1.82. Com a evolução do tempo este sinal desaparece dando maioritariamente origem a um sinal mais axial com os seguintes valores de g : 2.32, 2.26 e 1.94. Concomitantemente com o aparecimento dos sinais a campo alto, existe o desaparecimento da ressonância a $g = 4.3$ atrás atribuída ao centro II. Por sua vez as ressonâncias a $g = 7.7$, 5.7 e 4.1, provenientes do centro do tipo Dx, são mantidas.

Uma possível interpretação destes dados é a seguinte. O anião cianeto é uma molécula pequena que tem a possibilidade de se ligar a centros metálicos, dando origem a novas espécies de RPE (um exemplo é o caso das dioxigenases¹²). No caso da Dfx o alvo preferencial do cianeto será o centro II, uma vez que o sinal a $g = 4.3$ deu origem aos sinais a campo alto. Nas condições descritas, o centro do tipo Dx parece não ser afectado. A ligação do cianeto ao centro II poderá fazer-se numa posição de coordenação vazia, ou alternativamente por substituição de um ligando. O facto de existirem dois sinais de RPE dependentes do tempo de incubação faz admitir a possibilidade de num passo inicial apenas se ligar ao centro II uma molécula de cianeto, dando origem ao primeiro sinal. Posteriormente a ligação de uma segunda molécula será responsável pelo aparecimento do segundo sinal. Em qualquer dos casos, a ligação do cianeto ao centro II promove a passagem dum sistema férrico de spin alto ($S=5/2$) para um sistema igualmente férrico mas de spin baixo ($S = 1/2$). Toda esta análise poderá vir a ser substantiada por dados provenientes da espectroscopia de Mössbauer.

Foi também efectuada uma tentativa para proceder à quantificação dos sinais obtidos após a adição de cianeto. Para tal, foi assumido que o sinal proveniente do centro do tipo Dx é correspondente a 1 spin. A área total deste sinal foi calculada da seguinte forma: i) foi medida a área da ressonância a $g = 7.7$; ii) efectuiu-se uma correcção devido à anisotropia dos valores de g , segundo o método de Aasa e Vänngård.¹³ Segundo estes autores, a intensidade do sinal a g_x é dada pela seguinte expressão:

$$I_{g_x} = \frac{(g_y)^2 + (g_z)^2}{\sqrt{\left[1 - \left(\frac{g_y}{g_x}\right)\right]\left[1 - \left(\frac{g_z}{g_x}\right)\right]}}$$

de modo semelhante pode-se obter a intensidade do sinal aos valores de g_y e g_z ; *iii*) efectuou-se uma segunda correcção a esta área com base numa distribuição de Boltzman de modo a contabilizar a população dos três doubletos de Kramer, tal como anteriormente discutido (foi assumido que $D = +2.2 \text{ cm}^{-1}$).

A área dos sinais devidos à coordenação do cianeto foi efectuada de modo semelhante, tendo sido estimado o valor da área para as ressonâncias a $g = 2.545$ (sinal 1) e a $g = 1.90$ (sinal 2). A última correcção descrita não foi efectuada, pois estamos na presença de sistemas com $S = 1/2$.

Da quantificação do sinal 1 na amostra mais oxidada (forma cinzenta, figura VI.13c) obteve-se o valor de 0.24 spins. Este valor é bastante superior ao observado para a amostra menos oxidada (forma rosa, figura VI.14b), na qual se obteve 0.08 spins para a quantificação do mesmo sinal. Os resultados obtidos parecem indicar que o cianeto se coordena preferencialmente ao centro II, pois é na amostra com maior percentagem de forma totalmente oxidada que se obteve um maior valor para a quantificação de spins. Da quantificação do sinal 2 obtiveram-se os seguintes valores: 0.08 spins para a forma cinzenta (figura VI.13e) e 0.05 spins para a forma rosa (figura VI.14e). O facto destes valores serem inferiores aos observados para o sinal 1 (especialmente no primeiro caso) pode ser explicado tendo em conta que as incubações foram efectuadas sob uma atmosfera de argon. Esta atmosfera pode ter contribuído para que existisse a redução parcial do centro II, diminuindo assim a percentagem da espécie activa em RPE.

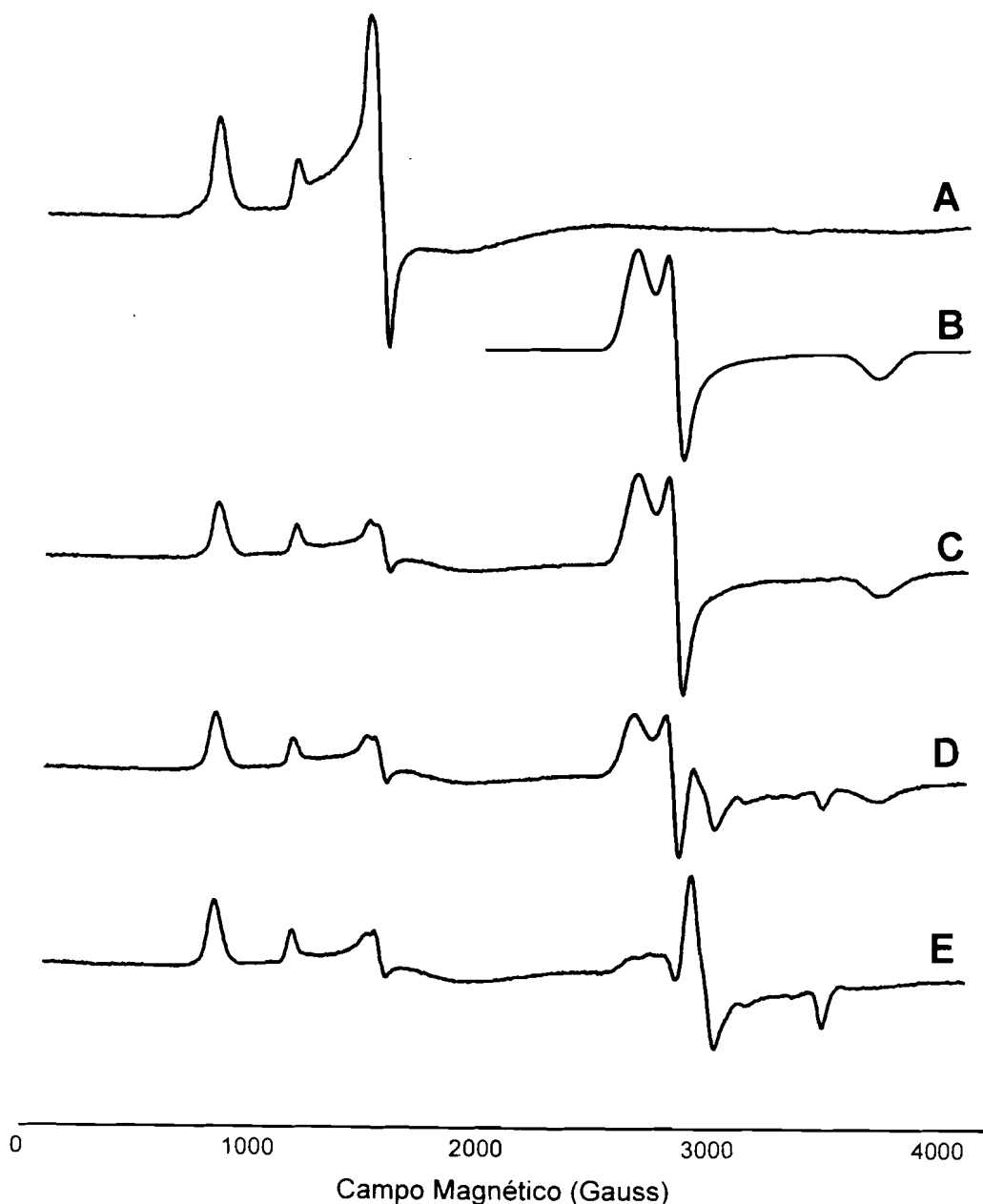


Figura VI.13 - Espectro de RPE da forma cinzenta da desulfoferrodoxina após adição de cianeto de potássio. Forma nativa (A); logo após a incubação com cianeto de potássio (B) e 15 min (D) ou 30 min (E) após a incubação com cianeto de potássio. O espectro B representa a simulação da espécie que aparece logo após a adição do cianeto (ver parâmetros da tabela 6). Condições experimentais: temperatura, 7.9 (A, C) e 8.7 (D, E) K; frequência da micro-onda igual a 9.431 GHz; potência da micro-onda igual a 2 mW, amplitude de modulação igual a 1 mT e ganho igual a 1×10^4 .

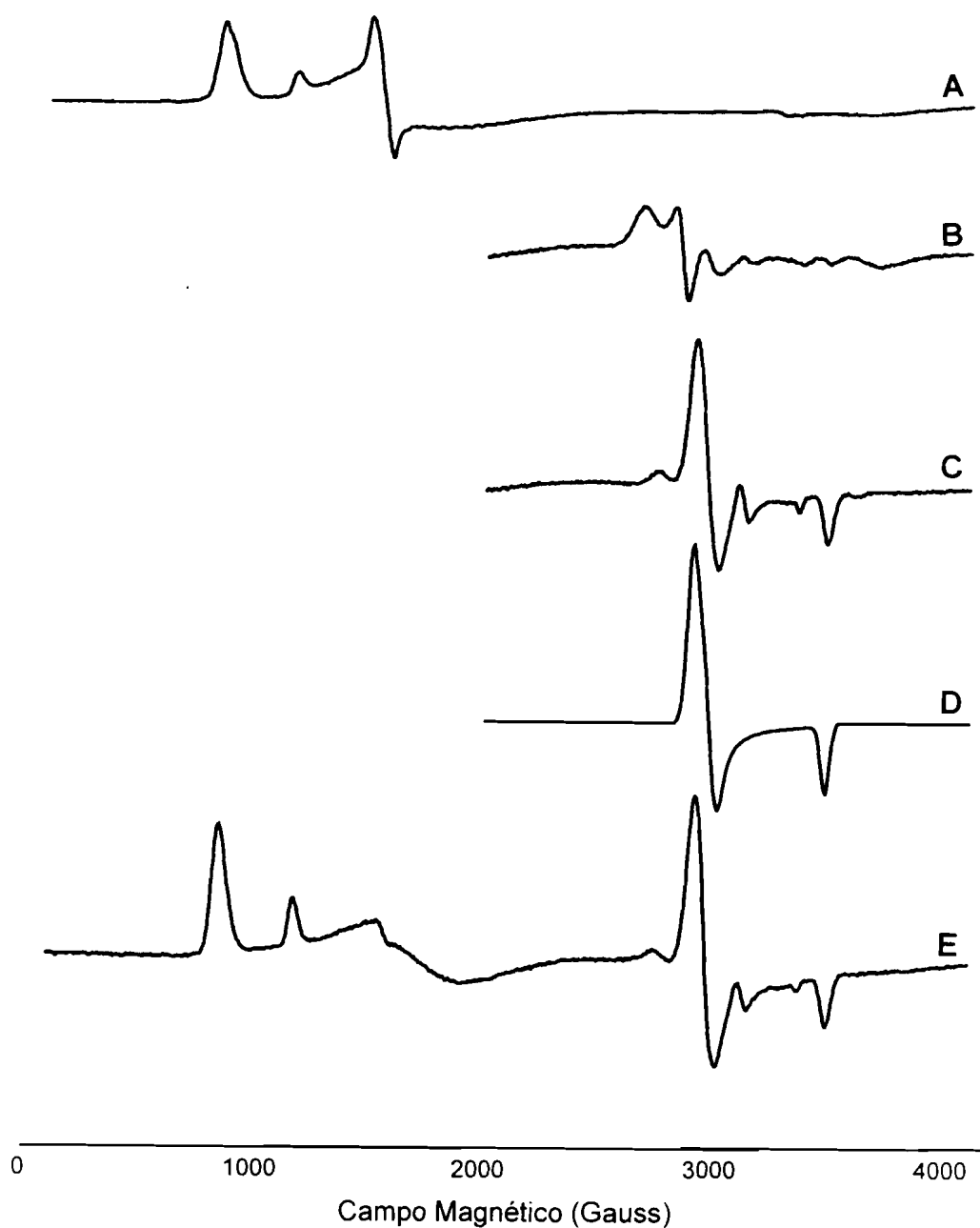


Figura VI.14 - Espectro de RPE da forma rosa da desulfoferrodoxina após adição de cianeto de potássio. Forma nativa (A); logo após a incubação com cianeto de potássio (B) e 15 min (C) ou 30 min (E) após a incubação com cianeto de potássio. O espectro D representa a simulação da segunda espécie maioritária (ver parâmetros da tabela 6). Condições experimentais: temperatura, 8.3 (A, E), 8.7 (B), 8.0 (C) K; frequência da micro-onda igual a 9.431 GHz; potência da micro-onda igual a 2 mW, amplitude de modulação igual a 1 mT e ganho igual a 1×10^4 .

Tabela VI.6

Parâmetros usados para efectuar a simulação das duas espécies maioritárias resultantes da adição de KCN à Dfx.

	Sinal 1		Sinal 2	
	Valor de g	Largura de linha (Gauss)	Valor de g	Largura de linha (Gauss)
g_x	2.545	110	2.325	55
g_y	2.382	65	2.265	65
g_z	1.817	150	1.940	44

VI.7.3. Espectroscopia de Mössbauer.

A espectroscopia de Mössbauer é de grande utilidade, pois permite estudar os centros de ferro independentemente do estado de oxidação e do sistema de spin. Todas as espécies que contêm ferro na amostra em estudo podem ser quantificadas e caracterizadas. Procedeu-se, portanto, ao estudo da desulfoferrodoxina em três estados de oxidação diferentes: forma rosa, forma cinzenta e forma totalmente reduzida.

O espectro de Mössbauer da forma rosa adquirido a 4.2 K com um campo aplicado, paralelo ao feixe de radiação γ , de 500 Gauss (ver fig. VI.15) contém duas componentes maioritárias (cerca de 84% da absorvância total) e duas componentes minoritárias (aproximadamente 16%).

Uma das componentes maioritárias, $44 \pm 4\%$, é um dobleto de quadrupolo com os seguintes parâmetros: $\Delta E_Q = 2.8$ mm/s e $\delta = 1.04$ mm/s. Estes parâmetros são característicos de ferro ferroso de spin alto ($S = 2$) numa esfera de coordenação octaédrica e ligandos azotados ou oxigenados. Medidas desta mesma amostra feitas a 5 kG (fig. VI.16) revelaram que esta componente comporta-se como um centro mononuclear, ou seja apenas uma espécie paramagnética é observável. Assim, e tendo em conta os resultados das espectroscopias de

UV-visível e RPE, é lícito assumir que esta componente provém do centro II na sua forma reduzida.

A outra componente maioritária, $40 \pm 4\%$, é praticamente idêntica ao espectro obtido para o estado oxidado da Dx^{14,15}. Com efeito, esta componente pode ser simulada assumindo os parâmetros obtidos para a Dx (ver fig. VI.15, tabela VI.6), isto é assumindo um sistema férrico de spin alto ($S = 5/2$) com $D = +2.2 \text{ cm}^{-1}$ e $E/D = 0.08$. O hamiltoneano usado para efectuar a simulação foi o seguinte:

$$\hat{H} = \hat{H}_e + \hat{H}_n$$

Em que \hat{H}_n descreve as interacções hiperfinas com o nucleo de ⁵⁷Fe e tem a seguinte expressão:

$$\hat{H}_n = \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} + \left(\frac{eQV_z}{4} \right) \left[I_z^2 - \frac{I(I+1)}{3} + \frac{\eta}{3} (I_x^2 - I_y^2) \right] - g_n \beta_n \vec{H} \cdot \vec{I}$$

Uma das componentes minoritárias, $8 \pm 2\%$ com componentes situadas entre -7.5 e +9.0 mm/s, pode ser atribuída ao estado oxidado do centro II. Os parâmetros característicos desta espécie foram determinados na forma cinzenta já que nesta forma o centro II está quase totalmente no estado oxidado, o que implica que esta componente corresponde aproximadamente a 50% da totalidade da absorvância (ver discussão do espectro da forma cinzenta).

A outra componente, $8 \pm 2\%$, tem parâmetros característicos (constantes de acoplamento hiperfinas e desvio isomérico) de ferro férrico de alto spin, coordenado tetraedricamente a enxofres. O seu espectro foi simulado usando o seguinte conjunto de parâmetros: $D = 1.5 \text{ cm}^{-1}$, $E/D = 0.14$ e $A/g_n \beta_n = 17.0 \text{ Tesla}$, $\Delta E_Q = -0.3 \text{ mm/s}$, $\delta = 0.3 \text{ mm/s}$ e $\eta = 1.0$. Esta componente pode ser atribuída a uma alteração no centro Dx (aumento do número de ligandos e/ou mudança conformacional).

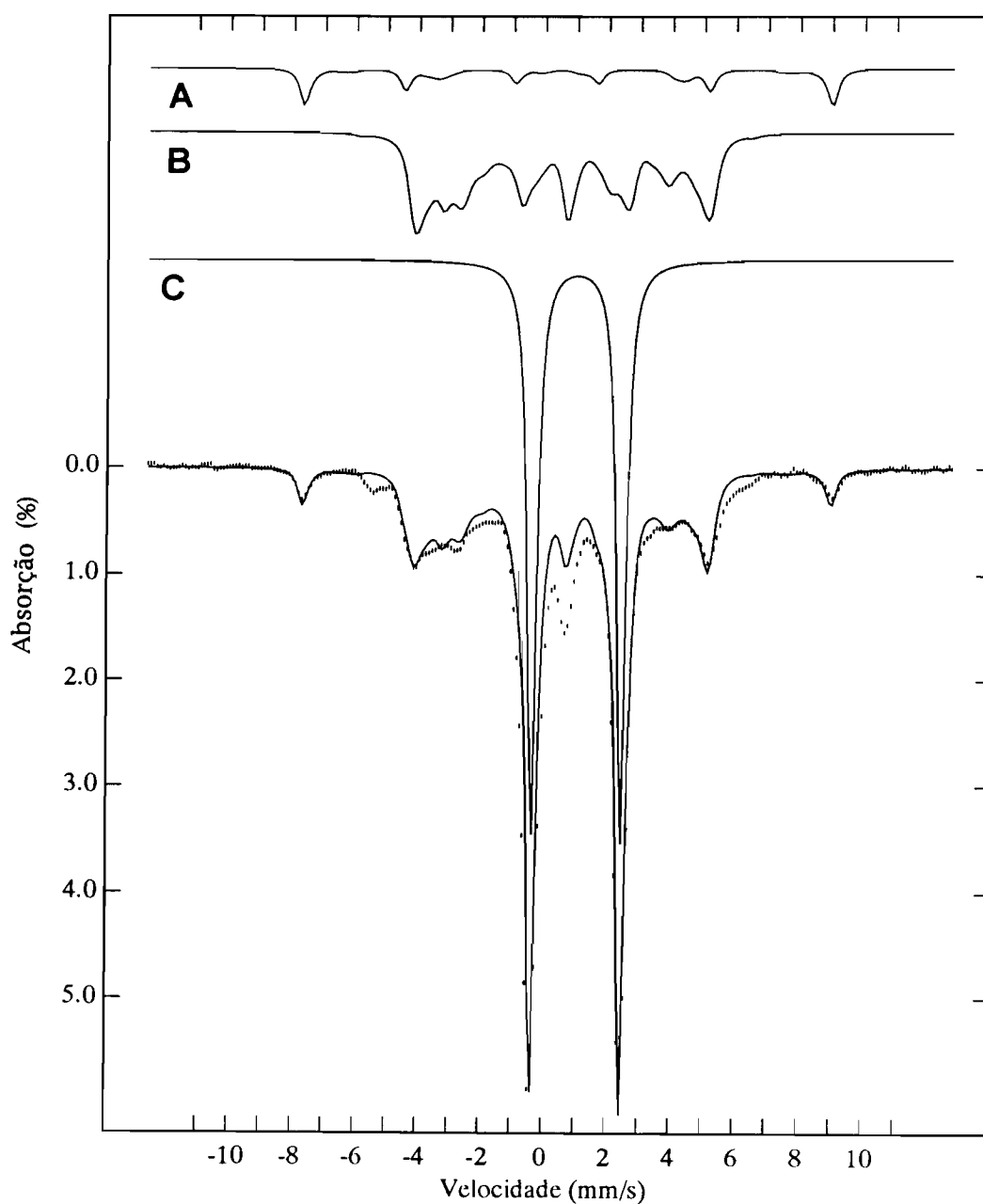


Figura VI.15 - Espectro de Mössbauer da forma rosa da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774, adquirido a 4.2 K na presença de um campo magnético aplicado (paralelo ao feixe de radiação γ) de 500 G. No topo do espectro apresentam-se as simulações das seguintes componentes: (A) centro II, estado oxidado; (B) centro do tipo Dx, estado oxidado e (C) centro II, estado reduzido. A linha sobreposta ao espectro experimental é constituída pela soma de 8% da componente A, 40% da componente B e 44% da componente C.

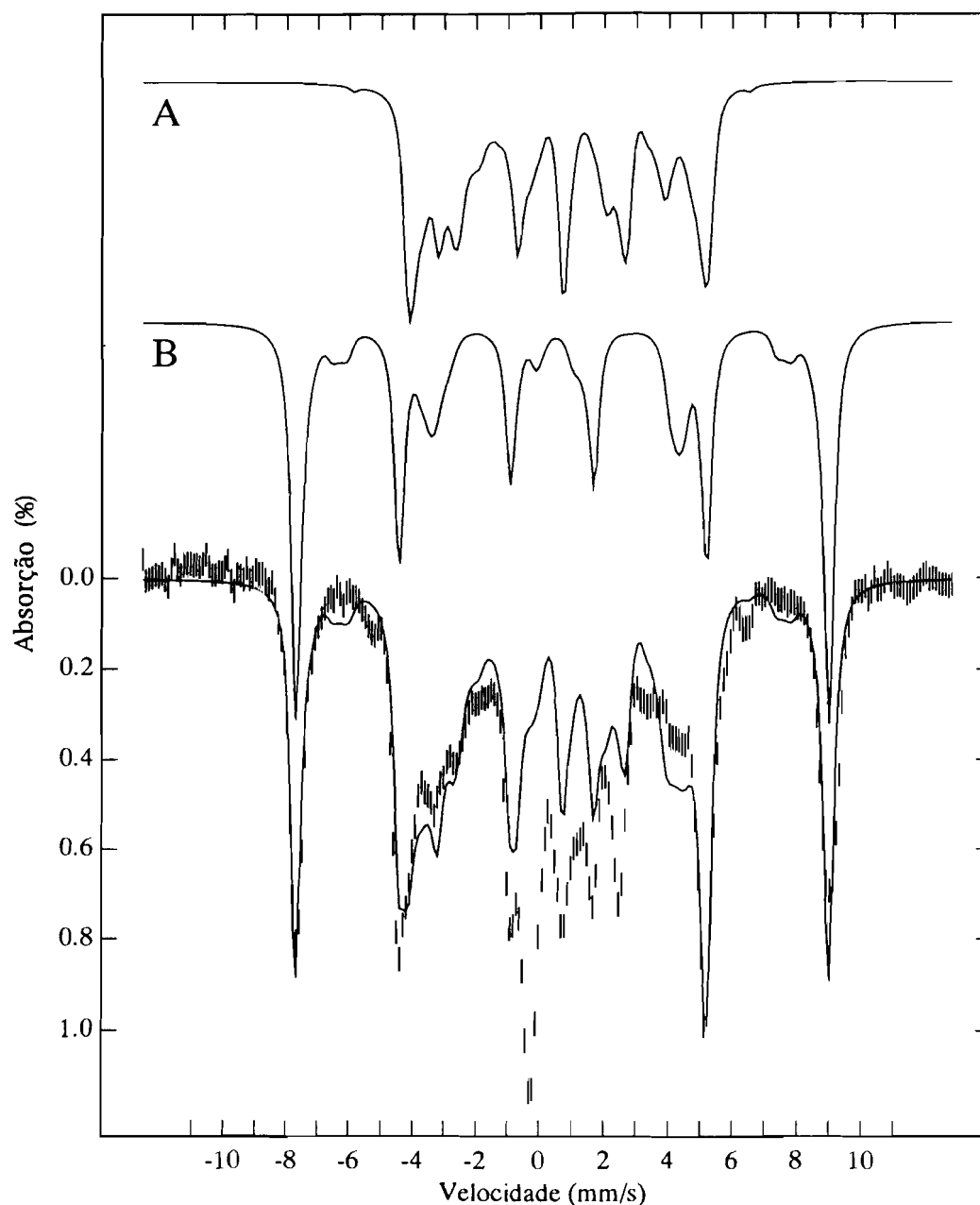


Figura VI.16 - Espectro de Mössbauer da forma cinzenta da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774, adquirido a 4.2 K na presença de um campo magnético aplicado (paralelo ao feixe de radiação γ) de 500 G. No topo do espectro apresentam-se as simulações das seguintes componentes: (A) centro II, estado oxidado e (B) centro do tipo Dx. A linha sobreposta ao espectro experimental é constituída pela soma de 42% da componente A e 40% da componente B.

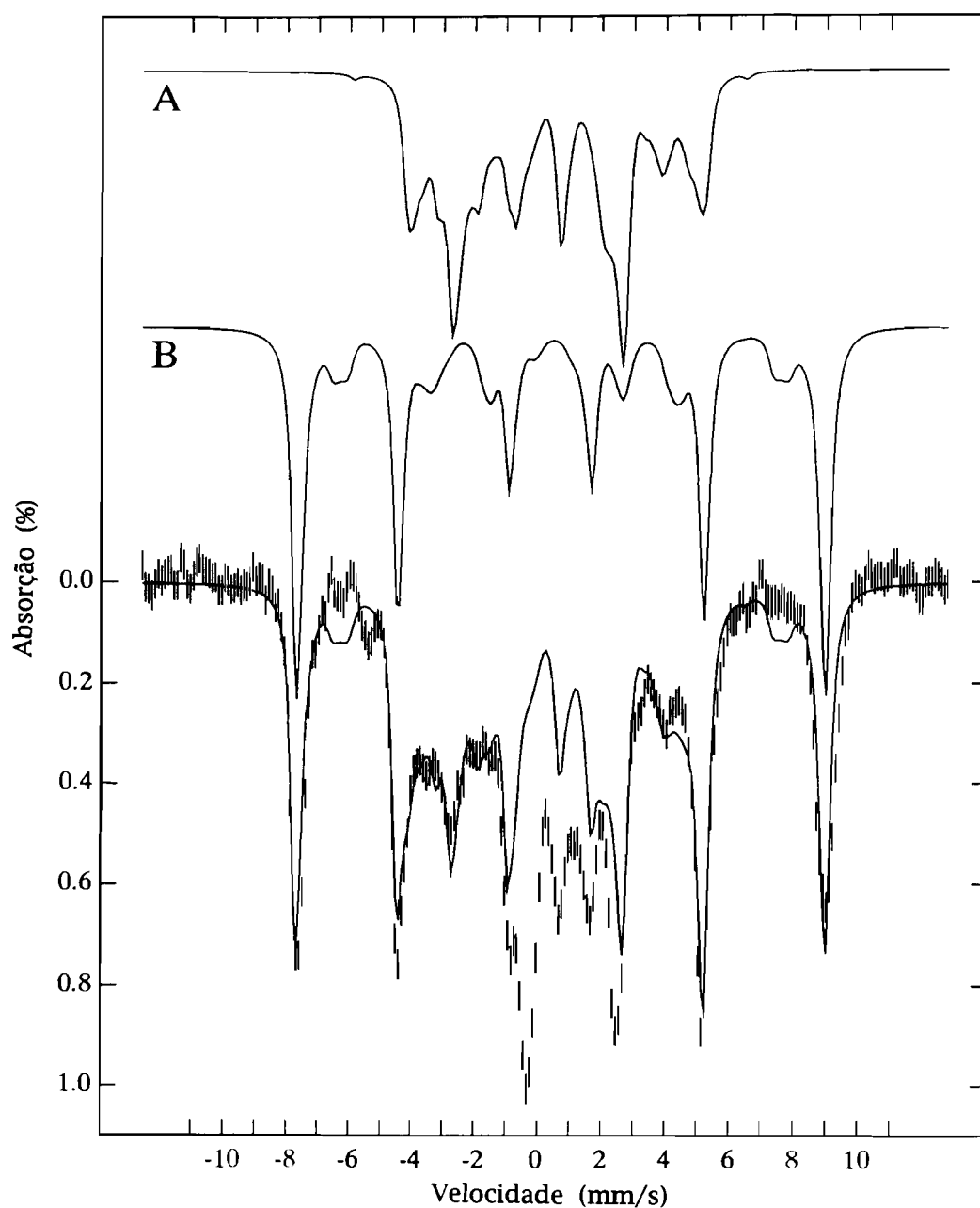


Figura VI.17 - Espectro de Mössbauer da forma cinzenta da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774, adquirido a 4.2 K na presença de um campo magnético aplicado (perpendicular ao feixe de radiação γ) de 500 G. No topo do espectro apresentam-se as simulações das seguintes componentes: (A) centro II, estado oxidado e (B) centro do tipo Dx. A linha sobreposta ao espectro experimental é constituída pela soma de 42% da componente A e 40% da componente B.

Esta hipótese é apoiada pela existência de uma componente idêntica para a Dx e também, em menor percentagem, para a Rb de *D. gigas*¹⁵. Por estar associada ao centro do tipo Dx esta componente passará a ser referida como Dx'. A análise de diversas amostras de Mössbauer (provenientes de diferentes purificações) também revelou que esta componente aparece associada ao centro do tipo Dx, já que o aumento na sua percentagem implica um decréscimo na percentagem proveniente deste centro. Esta espécie pode também ser detectada no espectro de RPE, onde exibe uma ressonância característica a $g = 8.9$.

O espectro de Mössbauer da forma cinzenta adquirido à temperatura de 4.2 K na presença de um campo aplicado de 500 Gauss, paralelo ao feixe de radiação γ (ver fig. VI.16), contém por sua vez, quatro diferentes componentes. Nesta forma o centro II está na forma oxidada. Assim não é de estranhar que $\approx 42\%$ do espectro corresponda a essa espécie que, como anteriormente foi referido, apenas existia numa percentagem minoritária (8%) na forma rosa. Esta espécie tem parâmetros típicos de ferro férrico de spin alto, com $D = -1.37$ e $E/D = 0.28$ (ver tabela VI.7 para lista completa de parâmetros). Os parâmetros hiperfinos utilizados para simular este espectro possuem as seguintes características:

- i) Valor de D baixo, isto é pequeno desdobramento a campo zero;
- ii) E/D rômbico;
- iii) Valor alto e quase isotrópico para A (A médio aproximadamente igual a 210 Gauss);
- iv) Valor de ΔE_Q baixo (0.53 mm/s) e
- v) δ igual a 0.5 mm/s

Estas características indicam que a esfera de coordenação será provavelmente constituída por ligandos azotados ou oxigenados. No entanto, um caso de ligação mista não pode ser eliminado uma vez que este valor de desvio isomérico também pode ser explicado por uma coordenação do ferro a um, ou dois, ligandos contendo enxofre e respectivamente cinco, ou quatro ligandos contendo azotos e/ou oxigénios. Outra possibilidade é a de o centro ser pentacoordenado a ligandos azotados e oxigenados. De referir ainda que mesmo a 200 K a velocidade de relaxação do spin electrónico é demasiado lenta quando comparada com a frequência de precessão nuclear, o que faz com que não seja possível a obtenção de

um dobleto de quadrupolo a alta temperatura. Este facto impede que o valor de desvio isomérico (bem como o valor de ΔE_Q) possa ser estimado com maior precisão.

Tabela VI.7

Parâmetros usados nas simulações dos espectros de Mössbauer dos diversos estados de oxidação dos dois centros da Desulfoferrodoxina (4.2 K)

Estado Oxidado (Fe³⁺)	Centro do tipo Dx	Centro II
D (cm ⁻¹)	2.2 ± 0.3	-1.4 ± 0.2
E/D	0.08 ± 0.005	0.28 ± 0.02
ΔE_Q (mm/s)	-0.75 ± 0.05	0.53 ± 0.03
η	0.6 ± 0.3	-2.5 ± 0.5
β	90	0
A_{xx}, A_{yy}, A_{zz} (kG)	-154 ± 10, -154 ± 5, -154 ± 10	-221 ± 5, -206 ± 2, -213 ± 2
Γ (mm/s)	0.30	0.35
δ (mm/s)	0.25 ± 0.06	0.50 ± 0.02
Estado Reduzido (Fe²⁺)		
δ (mm/s)	0.70 ± 0.02	1.07 ± 0.03
ΔE_Q (mm/s)	3.55 ± 0.03	2.87 ± 0.03
Γ (mm/s)	0.3	0.3

Os restantes componentes deste espectro são os seguintes: i) parte do centro II (cerca de 8% da absorvância total) está no estado reduzido, portanto está presente na forma do dobleto de quadrupolo descrito para a forma rosa; ii) o centro do tipo Dx está totalmente na forma oxidada, sendo a sua contribuição para a absorvância total do espectro de cerca de

40%; iii) aproximadamente 8% da absorvância total é atribuída à espécie atrás descrita como Dx'.

Na figura VI.17 apresentam-se os espectros da forma cinzenta a diferentes campos magnéticos aplicados. Estes espectros foram ajustados usando os parâmetros da tabela VI.7 e as percentagens atrás descritas.

A redução da forma cinzenta com quantidades equimolares de ascorbato de sódio (ver figura VI.18) produz um espectro quase idêntico ao obtido para a forma rosa. A espécie paramagnética característica do centro II no estado oxidado está presente em apenas 8%, enquanto que o dobleto de quadrupolo proveniente da forma reduzida pode ser quantificado em cerca de 42%. As outras componentes, provenientes do centro do tipo Dx, mantêm-se nas proporções atrás referidas.

A forma totalmente reduzida da proteína (amostra reduzida com ditionito de sódio, espectro adquirido a 4.2K na ausência de campo magnético aplicado) é constituída por dois dobletos de quadrupolo de intensidade igual (ver figura VI.19a). Como seria de esperar, um dos dobletos apresenta valores ($\Delta E_Q = 3.55 \text{ mm/s}$ e $\delta = 0.70 \text{ mm/s}$) quase idênticos ao da Dx de *D. gigas* ($\Delta E_Q = 3.51 \pm 0.03 \text{ mm/s}$ e $\delta = 0.69 \pm 0.02 \text{ mm/s}$). O segundo dobleto, pertencente ao centro II, tem os seguintes parâmetros: $\Delta E_Q = 2.87 \pm 0.03 \text{ mm/s}$ e $\delta = 1.07 \pm 0.02 \text{ mm/s}$. Como se pode verificar, estes parâmetros são idênticos aos obtidos para o dobleto de quadrupolo encontrado na forma rosa. De referir que este espectro foi obtido por redução da proteína com ditionito de sódio, quer para a amostra da forma cinzenta quer para a amostra da forma rosa. Neste espectro existem ainda picos alargados a -0.85 e a $+2.95 \text{ mm/s}$ que podem ser atribuídos a uma pequena percentagem da espécie Dx'. Essa percentagem é dependente da preparação, como pode ser observado na figura VI.19b. Neste caso a espécie Dx' contribui em cerca de 22% para a absorção total do espectro.

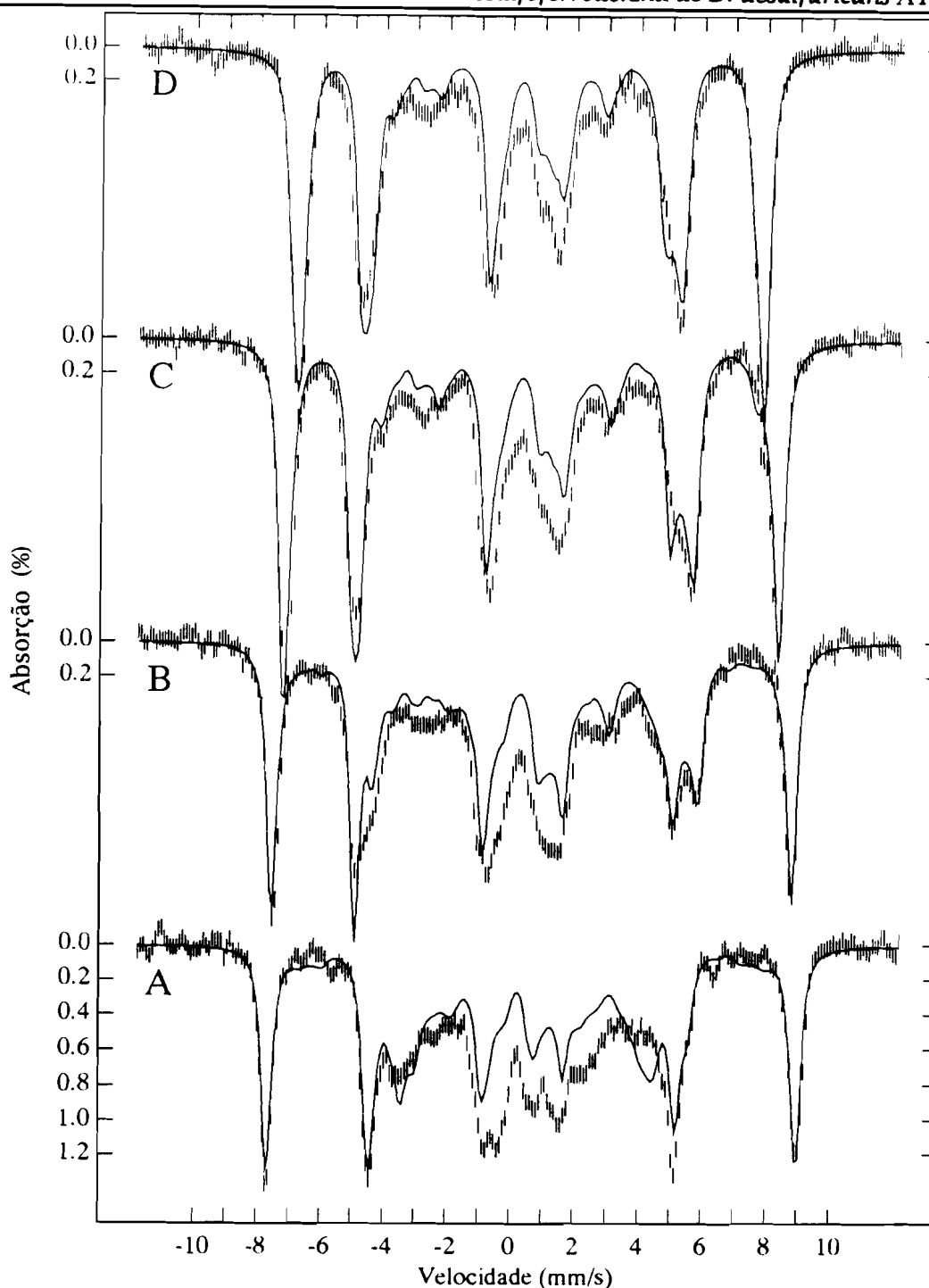


Figura VI.18 - Espectro de Mössbauer da forma cinzenta da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774, adquirido a 4.2 K na presença de diferentes campos magnéticos aplicados (paralelos ao feixe de radiação γ) de 5 (A), 20 (B), 50 (C) e 80 (D) kG. A linha sobreposta ao espectro experimental é constituída pela soma de 42% da componente relativa ao centro II no estado oxidado e 40% da componente relativa ao centro do tipo Dx no estado oxidado.

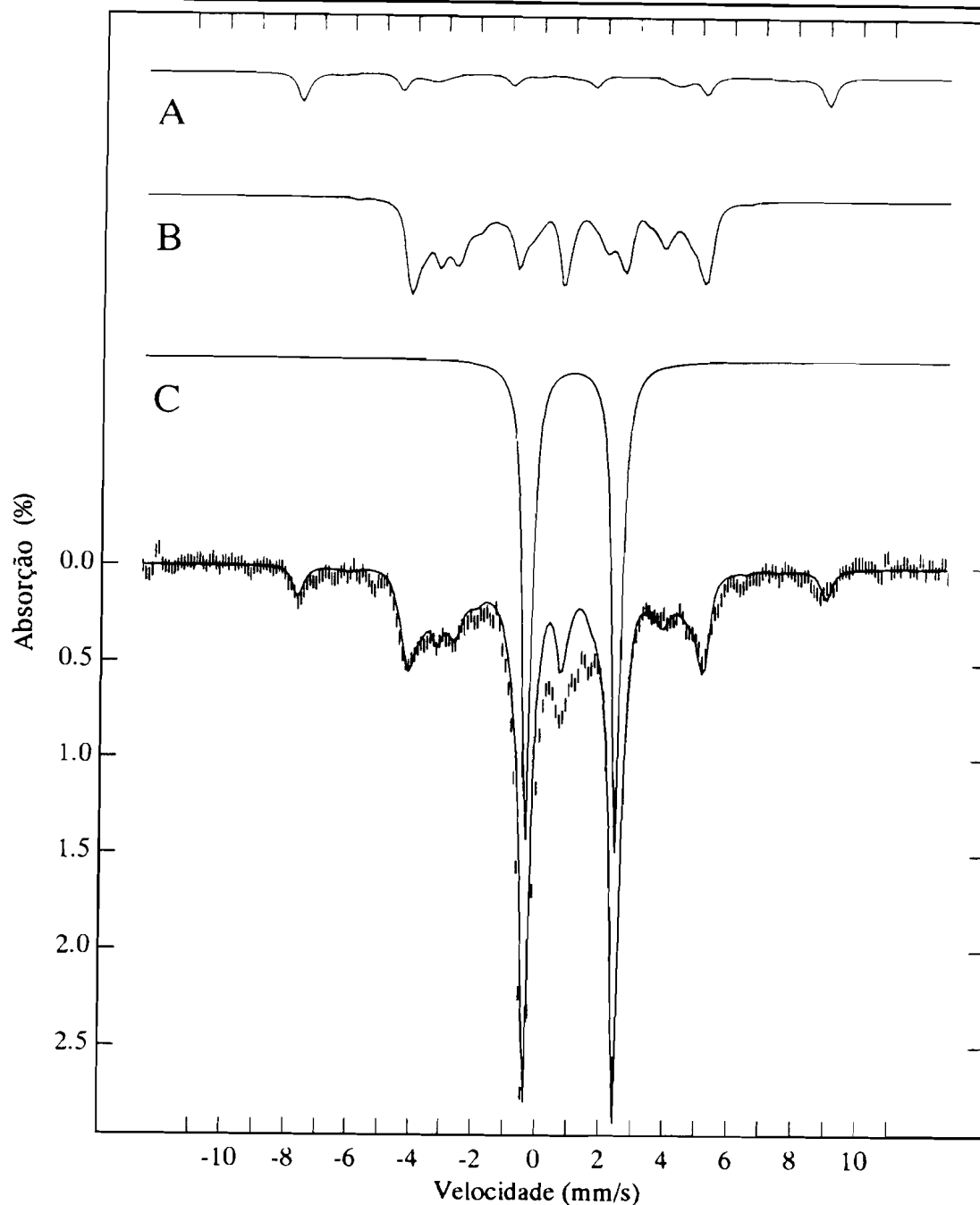


Figura VI.19 - Espectro de Mössbauer da forma cinzenta da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774, após adição de ascorbato de sódio em quantidades equimolares. O espectro foi adquirido a 4.2 K na presença de um campo magnético aplicado (paralelo ao feixe de radiação γ) de 500 G. No topo do espectro apresentam-se as simulações das seguintes componentes: (A) centro II, estado oxidado; (B) centro do tipo Dx, estado oxidado e (C) centro II, estado reduzido. A linha sobreposta ao espectro experimental é constituída pela soma de 8% da componente A, 40% da componente B e 40% da componente C.

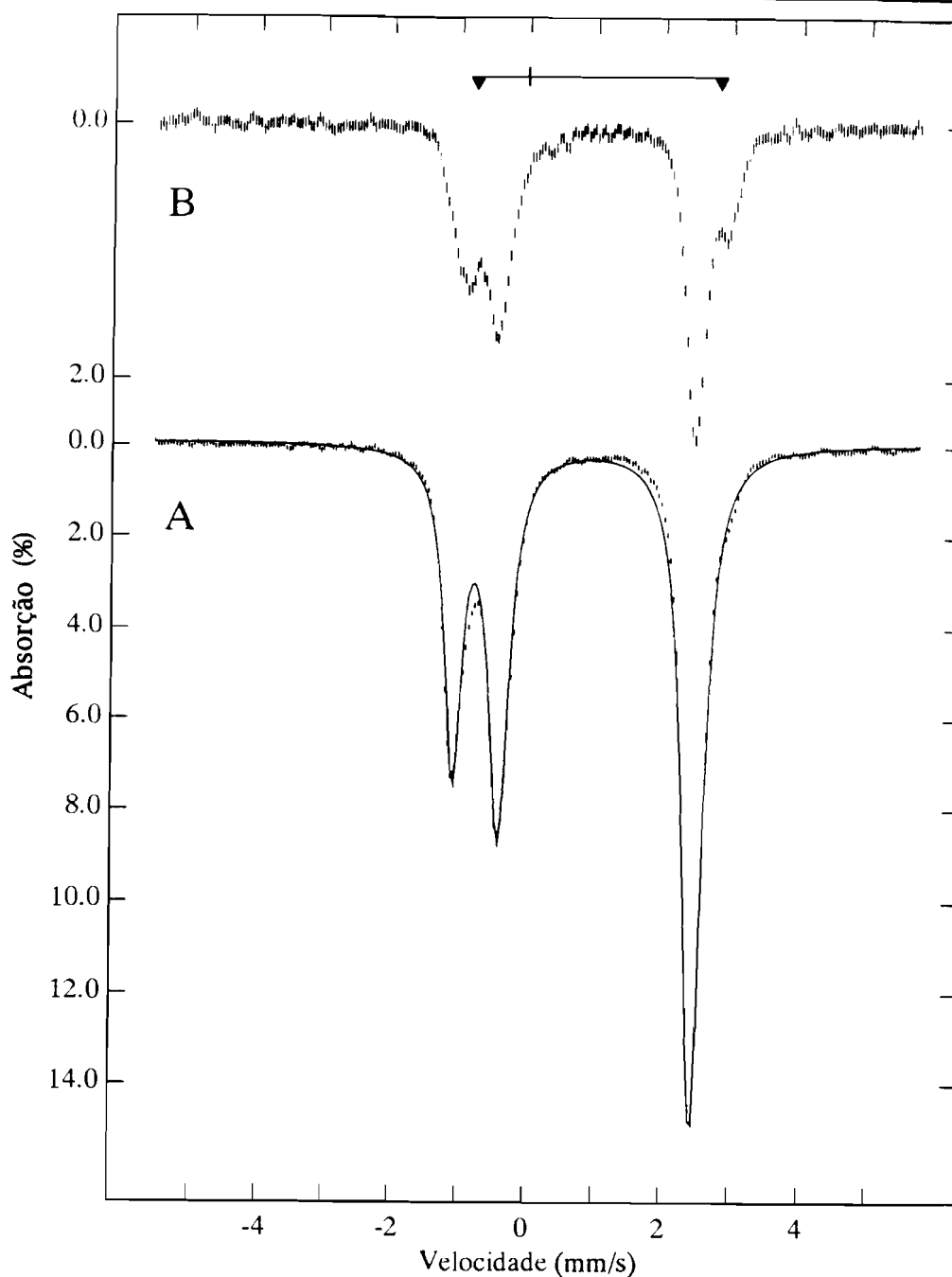
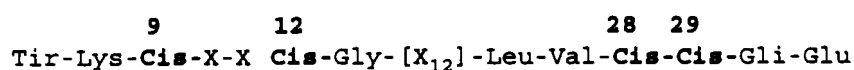


Figura VI.20 - Espectro de Mössbauer da desulfoferrodoxina de *D. desulfuricans* ATCC 27774, após adição de ditionito de sódio. Os espectros foram adquiridos a 4.2 K na ausência de um campo magnético aplicado. A linha sobreposta ao espectro A é constituída por dois dobletos de quadrupolo de igual intensidade. O espectro B é referente a uma amostra que possuía uma quantidade elevada ($\approx 22\%$) da espécie Dx' (dobleto assinalado no topo do espectro).

VI.8. Discussão.

Os estudos efectuados permitiram caracterizar esta proteína e os seus centros metálicos, com algum detalhe. Do ponto de vista bioquímico, a desulfoferrodoxina apresenta-se sob a forma monomérica tendo uma massa molecular de 14 kDa. Cada monómero possui dois átomos de ferro, não hémico, não sendo detectada a presença de enxofre lábil. Da descrição da sua purificação é fácil verificar que se trata de uma proteína pouco acidica.

Dos dados já descritos foi possível concluir que na Dfx os dois centros monoméricos não são equivalentes. Um desses centros é idêntico ao centro encontrado na Dx. As evidências são muitas, uma vez que todas as técnicas usadas na caracterização desta proteína apontam para esse mesmo facto. A similaridade da região N-terminal da desulfoferrodoxina com a Dx de *D. gigas* é bastante elevada. Em particular o seguinte padrão de cisteínas:



Estas são as cisteínas consideradas como ligandos do ferro no centro do tipo Dx. A presença deste padrão no N-terminal da desulfoferrodoxina é uma forte indicação da presença de um centro deste tipo.

Todas as outras provas vêm dos estudos espectroscópicos, dos quais é possível identificar nos espectros de UV-visível, RPE e Mössbauer a componente proveniente dum centro do tipo Dx.

O facto da Dfx possuir um centro do tipo Dx permitiu também que uma das hipóteses anteriormente elaborada¹⁶ para a coordenação do ferro nos centros do tipo Dx fosse eliminada. Assim, e porque a Dx é um dímero, existiam duas hipóteses possíveis para a coordenação dos centros (ver figura VI.15):

i) As quatro cisteínas que estão a coordenar o ferro pertencem ao mesmo monómero (resíduos Cis-9, Cis-12, Cis-28, e Cis-29).

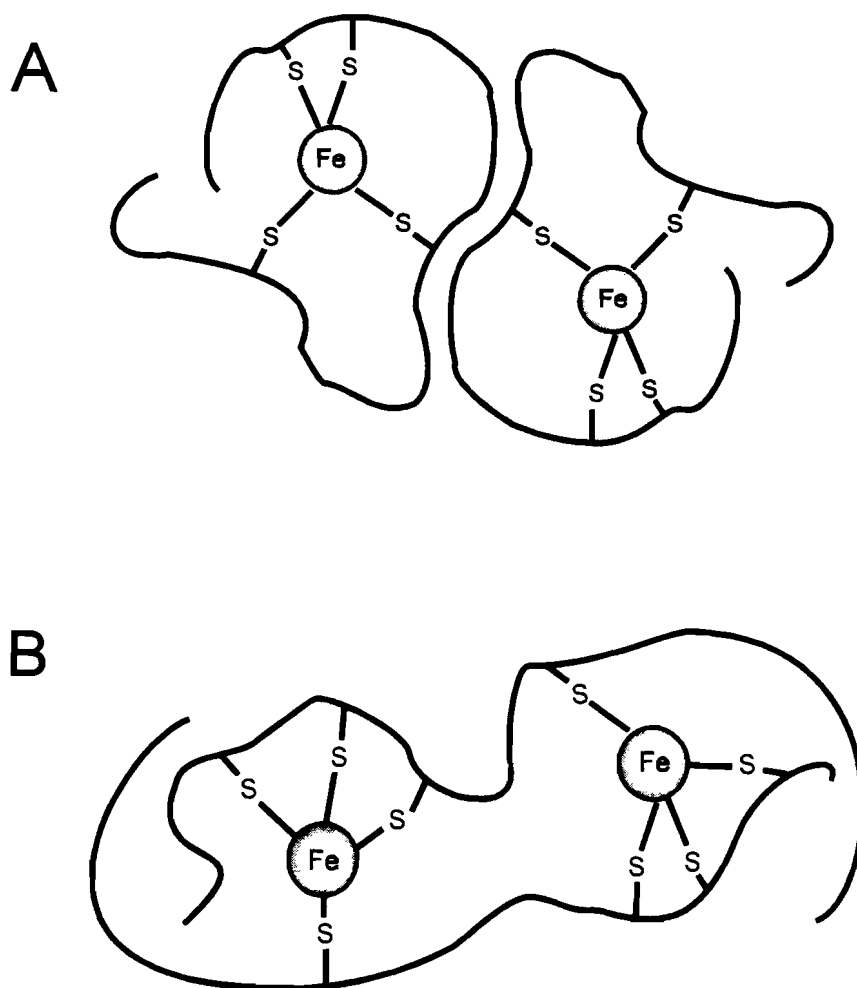


Figura VI.21 - Hipóteses admitidas para a coordenação do centro metálico na desulfoferrodoxina *D. gigas*: (A) O ferro é coordenado por quatro cisteínas de um único monómero; (B) Ambas as subunidades participam na coordenação do ferro.

ii) Três cisteínas pertencem a uma das cadeias polipeptídicas e a quarta pertence à segunda cadeia polipeptídica (por exemplo os resíduos Cis-9, Cis-12 e Cis-28 pertencentes a uma cadeia e o resíduo Cis-29 pertencente à outra). Neste caso a ligação entre as subunidades seria covalente e mediada pelo centro metálico.

Sabendo da presença do centro do tipo Dx na Dfx e que esta última é monomérica, podemos rejeitar a segunda hipótese e afirmar que são as quatro cisteínas da mesma cadeia polipeptídica que estão envolvidas na ligação do centro.

Para além do centro do tipo Dx, encontrámos um outro centro de estrutura desconhecida. Os dados espectroscópicos apresentados levam a concluir que este centro é constituído por um único ferro coordenado octaetricamente a ligandos contendo oxigénio e/ou azoto. A presença de ligandos contendo enxofre (cisteínas) não pode ser no entanto excluída (ver secção de Mössbauer). Este centro possui um potencial de oxidação-redução bastante elevado (aproximadamente 240 mV). Foi este facto que permitiu que a proteína fosse purificada em dois estados de oxidação diferentes. Na tabela VI.8 estão indicados os estados de oxidação possíveis para a Dfx. Trata-se de uma característica pouco usual ser possível isolar uma proteína aerobicamente no estado semi-reduzido (forma rosa) e no estado totalmente oxidado (forma cinzenta).

Tabela VI.8

Estados de oxidação dos centros nas diversas formas da Desulfoferrodoxina

Nome do estado de oxidação	Centro do tipo Dx	Centro II
Forma Cinzenta	Fe ³⁺	Fe ³⁺
Forma Rosa	Fe ³⁺	Fe ²⁺
Forma Totalmente Reduzida	Fe ²⁺	Fe ²⁺

No entanto ambas as formas coexistem ao potencial "atmosférico" e essa mistura é passível de ser resolvida obtendo-se assim amostras contendo maioritariamente uma das formas (tal como foi descrito no procedimento de purificação).

Os parâmetros de Mössbauer obtidos para o estado ferroso do centro II são muito pouco usuais. Este valor de desvio isomérico é mais elevado que os valores típicos para centros de ferro-enxofre (0.6 a 0.7 mm/s) ou hemos (cerca de 0.9 mm/s). É no entanto mais baixo que o obtido para proteínas como a 4,5-dioxigenase do protocatecuato, 3,4-dioxigenases e átomos de ferro ferroso existentes em agregados binucleares tais como os da hemeritrina, rubreritrina e fosfatase ácida púrpura (para os quais o desvio isomérico é maior que 1.1 mm/s). Existem no entanto dois sistemas que se aproximam bastante dos valores obtidos para a desulfoferrodoxina e que passamos a discutir de seguida.

Um dos sistemas passível de ser comparado à Dfx é a sintetase da isopenicilina N (IPNS). Esta proteína catalisa a condensação oxidativa do δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina a isopenicilina N. É uma proteína monomérica com massa molecular igual a 38 kDa e que contém um átomo de ferro por molécula. No estado nativo este ferro possui características de um ferro ferroso de spin alto. Os valores obtidos para o desvio isomérico e desdobramento de quadrupolo são respectivamente 1.30 mm/s e 2.70 mm/s. Pensa-se que neste estado o ferro se encontra octaetricamente ligado a azotos e oxigénios. Após ligação do substrato uma nova espécie aparece no espectro de Mössbauer, tendo $\delta = 1.11$ mm/s e $\Delta E_Q = 3.43$ mm/s. Esta nova espécie é atribuída à ligação do substrato que em termos da esfera de coordenação implica a substituição de um ligando oxigenado por um contendo enxofre. Estes valores parecem indicar a presença de uma ligação octaédrica mista para a desulfoferrodoxina.

É também possível fazer uma comparação entre a desulfoferrodoxina e a lipoxigenase L-1 extraída da semente de soja, com base nas semelhanças a nível espectroscópico. Esta proteína contém um átomo de ferro por molécula, que no estado nativo foi caracterizado como um ferro ferroso de spin alto. Os parâmetros obtidos pela espectroscopia de Mössbauer para o duplo de quadrupolo presente no estado nativo

($\delta = 0.96$ mm/s, $\Delta E_Q = 3.13$ mm/s)¹⁷ são bastante parecidos aos obtidos para a desulfoferrodoxina, indicando que o centro é octa- ou penta-coordenado a ligandos contendo azoto e oxigénio.

Recentemente foi obtida, por cristalografia de raios-X, a estrutura do centro da lipoxigenase L-1¹⁸. Estes dados revelam que o ferro está coordenado por três histidinas (His-499, His-504 e His-690), uma asparagina (Asn-694) e pelo carboxilato do C-terminal (Ile-839). O arranjo destes cinco ligandos parece ser octaédrico, estando a sexta posição aparentemente vaga já que nenhum resíduo da cadeia polipeptídica parece ocupá-la. No entanto, esta posição está na fronteira dum "canal/fosso" que comunica com a superfície da molécula e uma possibilidade é a de estar ocupada por uma molécula de água. Parece também provável que este "canal/fosso" seja o sítio de ligação do substrato.

Os dois casos aqui apresentados têm parâmetros semelhantes ao centro II da Dfx. Devido ao erro na estimativa dos parâmetros e à proximidade dos valores apresentados torna-se extremamente difícil decidir entre estes dois tipos de coordenação, a saber: *i)* arranjo octaédrico, com ligandos azotados e oxigenados, na qual uma posição pode estar vaga; *ii)* ligação mista (um enxofre, sendo os restantes ligandos azotados e oxigenados) numa esfera de coordenação octaédrica.

Outros dados independentes são necessários para se poder compreender na totalidade o tipo de coordenação deste centro. Estudos recentes provenientes da espectroscopia de ressonância de Ramam indicam a ligação mista como a hipótese mais provável.¹⁹ O espectro de ressonância de Raman da forma cinzenta mostra bandas vibracionais que podem ser atribuídas a modos vibracionais de, pelo menos, uma cisteína coordenada ao ferro, sugerindo que a banda de absorção a 635 nm poderá ser devida a transições $S \rightarrow Fe(III)$. O espectro apresenta também algumas semelhanças com o espectro da hidratase do nitrilo, proteína cujo centro é constituído por um ferro férrico de spin baixo, com uma esfera de coordenação octaédrica na qual dois dos ligandos são resíduos de cisteína.

Recentemente, Verhagen e colaboradores²⁰ efectuaram uma análise detalhada da desulfoferrodoxina isolada de *D. vulgaris*. Nesse estudo os autores referem alguns dados que estão em contradição com o que foi descrito neste capítulo. Assim, com base em dados de cromatografia de exclusão molecular, a desulfoferrodoxina é descrita como sendo um homodímero. Tal como atrás foi descrito, por aplicação da mesma técnica obteve-se sempre uma banda de massa molecular igual a 14 kDa, razão pela qual a desulfoferrodoxina foi descrita neste capítulo como sendo monomérica.

O potencial do centro II da desulfoferrodoxina de *D. vulgaris* foi determinado através de uma titulação potenciométrica de RPE, na qual foi seguida a intensidade da ressonância a $g = 4.3$ em função do potencial. O valor obtido (+90 mV) é substancialmente inferior ao descrito neste capítulo (+240 mV). Na figura VI.22 apresentam-se duas curvas calculadas com base na equação de Nernst. Especial atenção deve ser dada à gama de potenciais entre +180 e +280 mV, pois é entre estes valores que se encontra o potencial das amostras purificadas. No caso da curva B (calculada para $E_0 = +240$ mV), dentro da gama referida, a população da espécie oxidada varia entre 8 e 85%. Esta observação está de acordo com o facto de ser possível isolar a desulfoferrodoxina em diferentes estados de oxidação. No caso da curva A (calculada para $E_0 = +90$ mV), a população da espécie oxidada mantém-se próxima dos 100%. Assim seria de esperar que apenas fosse possível isolar a proteína no estado totalmente oxidado (forma cinzenta). No entanto, e em total contraste com esta observação, Verhagen e colaboradores afirmam claramente que a proteína é isolada na forma semi-reduzida.

Finalmente, é sugerida uma coordenação hexa ou heptaédrica para o centro do tipo Dx. Esta hipótese é baseada na semelhança apresentada pelo espectro de RPE da desulfoferrodoxina com o do complexo FeDTPA. No entanto, o tipo de coordenação está em contradição com os dados de Mössbauer obtidos para as duas proteínas que contêm este tipo de centro. O baixo valor obtido para o desvio isomérico ($\delta = 0.25$ mm/s) é típico de uma coordenação tetraédrica de átomos de enxofre, tal como acontece na rubredoxina. Um aumento no número de coordenação e a participação, também sugerida, de ligandos

oxigenados e/ou azotados implicariam um valor de desvio isomérico mais elevado (como acontece para o centro II da Dfx).

A solução definitiva, para esclarecer as coordenações de ambos os centros, poderá residir na estrutura terciária da proteína obtida através da cristalografia de raios-X. O primeiro passo para esta determinação foi já dado, pois recentemente foram obtidos cristais desta proteína quer para a forma totalmente oxidada quer para a forma semi-reduzida.

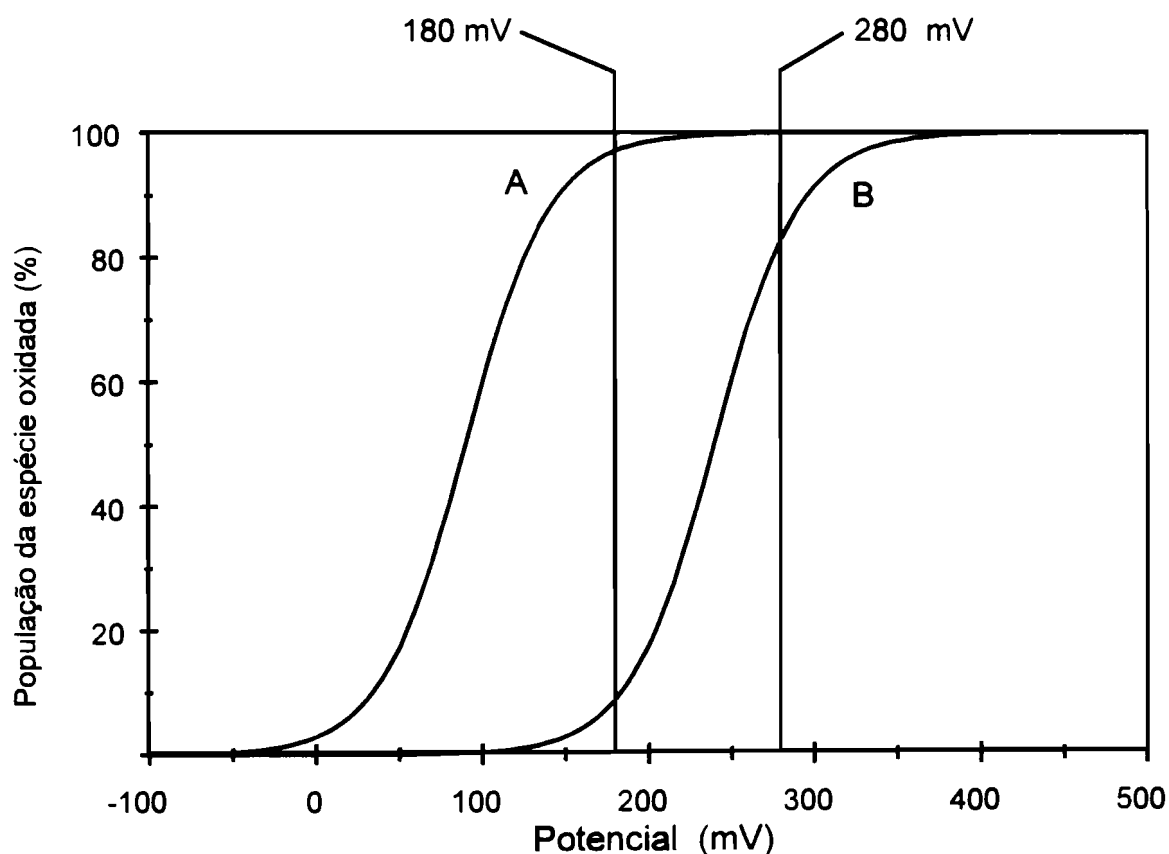


Figura VI.22 - Curvas teóricas calculadas com base na equação de Nernst para a variação da percentagem de forma oxidada em função do potencial. As curvas foram calculadas para potenciais de oxidação-redução iguais a 240 (A) e 90 (B) mV.

VI.9. Bibliografia.

1. Moura, I., Tavares, P., Moura, J.J.G., Ravi, N., Huynh, B.H., Liu, M.-Y., e LeGall, J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 21596-21602.
2. Brumlik, M.J., Voordouw, G., (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 9, 4996-5004.
3. Brumlik, M.J., LeRoy, G., Bruschi, M., e Voordouw, G., (1990) *J. of Bacteriol.* **172**, 12, 7289-7292.
4. Liu, M.-C., e Peck, H.D., Jr. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 13159-13164.
5. Lamelli - ref. 25 do artigo: Weber, K., e Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
6. Fischer, D.S., e Price, D.C. (1964) *Clin. Chem.* **10**, 21-31.
7. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
8. Moore, S., e Stein, W.H. (1963) *Methods Enzymol.* **46**, 41-45.
9. LeGall, J., Moura, J.J.G., Peck, H. D., Jr., e Xavier, A.V. (1982) in T.G. Spiro (ed.), *Iron-sulfur proteins*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
10. Hendrich, M.P., Debrunner, P.G. (1988) *J. Mag. Res.* **78**, 133-141.
11. Werth, M.T., Kurtz, D.M., Howes, B.D., e Huynh, B.H. (1989) *Inorg. Chem.* **28**, 1357-1361.
12. Whittaker, J.W., e Lipscomb, J.D. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 4487-4495.
13. Aasa, R., e Vänngard, T. (1975) *J. Magn. Res.* **19**, 308.
14. Moura, I., Xavier, A.V., Cammack, R., Bruschi, M., e LeGall, J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **533**, 156-162.
15. Moura, I., Huynh, B.H., Hausinger, R.P., LeGall, J., Xavier, A.V., e Münck, E. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2493-2498.
16. Moura, I., Bruschi, M., LeGall, J., Moura, J.J.G., e Xavier, A.V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1977) **75**, 1037-1044.

17. Dunham, W.R., Carrol, R.T., Thompson, J.F., Sands, R.H., e Funk, M.O., Jr. (1990) *Eur. J. Biochem.* **190**, 611-617.
18. Minor, W., Steczko, J., Bolin, J.T., Otwinowski, Z. e Axelrod, B. (1993) *Biochemistry* **32**, 6320-6323.
19. Tavares, P., Moura, J.J.G., LeGall, J., Huang, Y.-H., Crouse, B.R., Johnson, M.K., Huynh, B.H., e Moura, I. (1994) *J. Biol. Chem.*, em impressão.
20. Verhagen, M.F.J.M., Voorhorst, W.G.B., Kolkman, J.A., Wolbert, R.B.G., e Hagen, W.R. (1993) *FEBS Lett.* **336**, 13-18.

Capítulo VII.

CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA DE FERRO-ENZOFRE ISOLADA DE *D. desulfuricans* ATCC 27774

VII. Caracterização de uma nova proteína de ferro-enxofre	
isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774	209
1. Introdução.	211
2. Purificação.	213
3. Determinação da massa molecular.	215
4. Determinação do conteúdo em ferro.	215
5. Determinação do enxofre lábil.	217
6. Determinação da composição em ácidos aminados.	217
7. Determinação do N-terminal.	219
8. Estudos espectroscópicos.	219
8.1. Espectroscopia de UV-Visível.	219
8.2. Espectroscopia de RPE.	222
8.3. Espectroscopia de Mössbauer.	233
9. Discussão.	250
10. Bibliografia.	253

VII.1. Introdução.

No capítulo II foram descritos os diversos tipos de centros e agregados de ferro-enxofre conhecidos. A maioria das metaloproteínas caracterizadas até agora possuem um, ou mais, agregados de um dos três seguintes tipos: [2Fe-2S], [3Fe-4S] e [4Fe-4S]. São muito raros os casos para os quais há alguma evidência da existência de agregados com estequiometria superior a [4Fe-4S].

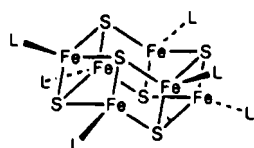
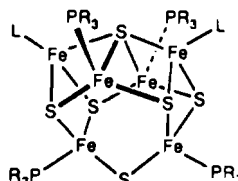
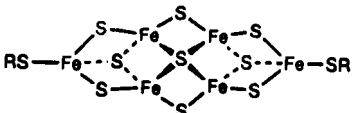
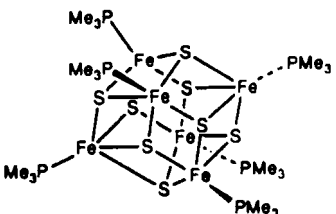
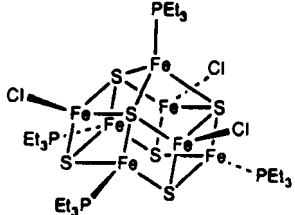
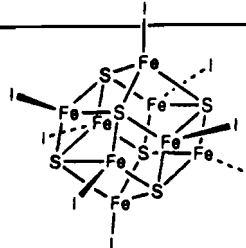
Apesar de raros nos sistemas biológicos, foi possível sintetizar agregados constituídos por seis, sete ou mesmo oito átomos de ferro. Estes compostos são preparados em meios reacionais contendo sais de ferro, uma fonte de sulfuretos e tiolatos, halogénios ou fosfinas terciárias. Diversos tipos de estruturas têm sido obtidas (ver tabela VII.1), sendo possível obter conversões entre alguns desses tipos.

Duas metaloproteínas, contendo exclusivamente ferro, foram recentemente isoladas a partir de duas diferentes estirpes de *Desulfovibrio*: *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774¹ e *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough.^{2,3} A combinação de duas técnicas espectroscópicas (RPE e Mössbauer) levaram à conclusão que ambas as proteínas possuíam pelo menos um agregado de [6Fe-6S]. Ambos os genes que codificam para estas duas proteínas, foram já clonados e sequenciados.^{4,5} A comparação entre as duas sequências revelou que 66% dos ácidos aminados são idênticos. Com a excepção de um segmento, que inicia no resíduo 40 e se estende aos 100 ácidos aminados seguintes, a homologia é bastante elevada. Dos 11 resíduos de cisteína presentes na proteína isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774 apenas dois deles não são conservados na proteína de *D. vulgaris* Hildenborough. Após clonagem, esta última proteína foi expressada em *D. vulgaris*, tendo-se obtido uma proteína idêntica à nativa com uma expressão 25 vezes superior à normal⁶.

Neste capítulo apresentam-se os dados referentes ao isolamento e caracterização da proteína de *D. desulfuricans* ATCC 27774, bem como a interpretação dos dados espectroscópicos que levaram à identificação dos novos agregados do tipo [6Fe-6S].

Tabela VII.1

Compostos inorgânicos contendo agregados com 6, ou mais, átomos de ferro.

Fórmula	Estados de oxidação	Número de átomos de Ferro	Estrutura	Referência
$Fe_6S_6(L)_6$ $L = Cl^-, Br^-, I^-, RS^-, RO^-$	-2/-3	6		7,8,9
$Fe_6S_6(PEt_3)_4X_2$ $X = Cl^-, Br^-, I^-$		6		10,11,12
$Fe_6S_9(SR)_2$ $R = Me, Et, CH_2Ph$	-4	6		13,14,15
$Fe_6S_8(PEt_3)_6(BPhy)_2$	+2/+1	6		16,17
$Fe_7S_6(PEt_3)_4Cl_3$		7		18
$(Et_4N)_3Fe_8S_6I_8 \cdot 2CH_2Cl_2$	-3	8		19

VII.2. Purificação.

A metodologia utilizada na obtenção do extrato celular encontra-se descrita no apêndice A - Métodos. Todos os passos da purificação foram efectuados a 4 °C e pH 7.6, excepto quando indicado em contrário. O primeiro passo da purificação é idêntico aos já descritos para a rubreritina e para a desulfoferrodoxina, já que todas estas proteínas são purificadas a partir do extrato celular de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Assim, cerca de 1.5 litros de extrato foram aplicados numa coluna (6 x 32.6 cm) de DEAE-52 (Whatman) equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM. A eluição foi feita através de um gradiente linear de Tris-HCl (10 a 500 mM) com o volume total de 3 litros. Foi colectada uma fracção entre 100 e 200 mM de Tris-HCl, com o volume de 1 litro, que continha principalmente proteínas hémicas.

Essa fracção foi dialisada contra água durante 12 horas e aplicada numa nova coluna de DEAE-52 (4 x 30 cm) equilibrada com Tris-HCl 10 mM, utilizando-se um gradiente do mesmo tampão (10 a 200 mM) com o volume total de 3 litros. A fracção eluída a cerca de 150 mM possuía uma coloração castanho-avermelhada, tendo o seu espectro de visível contribuições típicas de hemos bem como de agregados de ferro-enzofre. A fracção foi concentrada num Diaflo equipado com uma membrana YM5 (Amicon), sendo a força iónica diminuída por sucessivas adições de água bidestilada.

Após a concentração, a fracção foi aplicada numa coluna (2.5 x 15 cm) de hidroxilapatite (BioRad) equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM. Seguidamente, a proteína adsorvida foi eluída com um gradiente linear de tampão fosfato (1 a 200 mM) com o volume total de 500 ml. Uma fracção de cor castanha, eluída a cerca de 80 mM, foi colectada com um volume de 100 ml. Esta fracção apresentava um espectro de UV-visível bastante semelhante ao de outras proteínas contendo agregados de ferro-enzofre, possuindo uma razão de pureza A_{400}/A_{280} igual a 0.24. A fracção foi então concentrada num Diaflo equipado com uma membrana YM5, baixando-se a força iónica de modo idêntico ao atrás descrito.

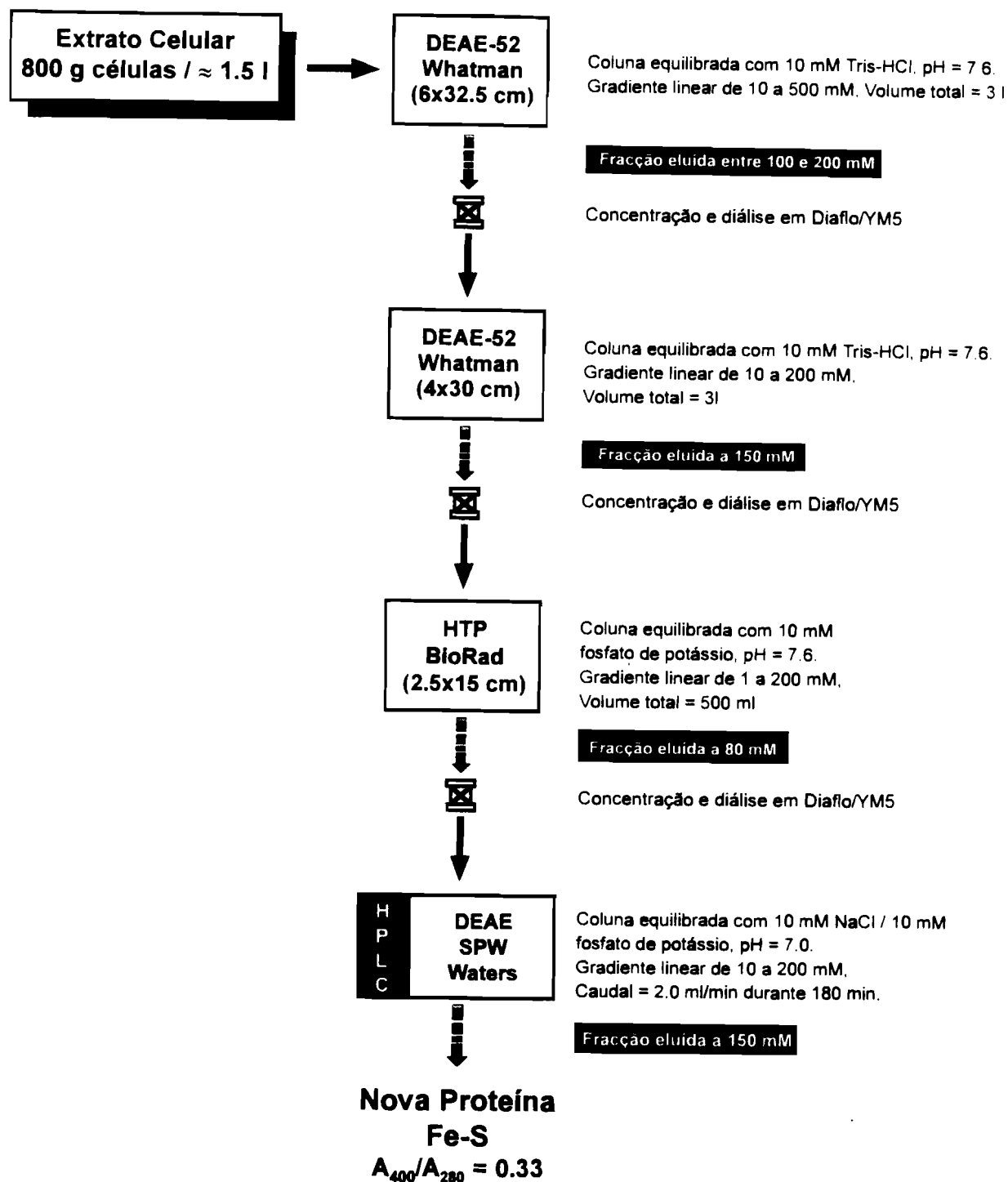


Figura VII.1 - Esquema da purificação da nova proteína de ferro-enzofre isolada de extratos celulares de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

Finalmente, o último passo da purificação foi efectuado recorrendo a um HPLC equipado com uma coluna DEAE SPW (Waters). A fracção concentrada no passo anterior foi aplicada após a coluna ter sido equilibrada com tampão 10 mM NaCl e 10 mM fosfato de potássio, com pH igual a 7.0. Utilizou-se um gradiente linear do mesmo tampão entre 10 mM e 200 mM com um caudal de 2 ml/min e uma duração total de 3 horas. A proteína foi eluída a 150 mM, possuindo agora uma razão A_{400}/A_{280} igual a 0.33.

VII.3. Determinação da massa molecular.

A massa molecular foi determinada por electroforese em gel de poliacrilamida a 12.5%, bem como por cromatografia de filtração em gel (ver apêndice A - Métodos). Pelo primeiro destes métodos foi possível verificar a existência de uma única banda com a massa molecular de 57 ± 1 kDa (ver figura VII.2). Por sua vez, o cromatograma obtido pelo segundo método descrito apresenta um único pico cuja massa molecular está de acordo com o valor estimado por electroforese. Da combinação destes dois resultados é possível concluir que esta proteína se apresenta na forma monomérica.

VII.4. Determinação do conteúdo em ferro.

A determinação da quantidade de ferro foi efectuada usando a espectroscopia de emissão por plasma e também métodos químicos.²⁰ A determinação da proteína foi efectuada recorrendo também a dois diferentes métodos. Assim, a quantidade de proteína foi estimada através da análise de ácidos aminados, bem como pelo método de Lowry.²¹ A tabela VII.2 apresenta os resultados obtidos para diversas amostras, com e sem enriquecimento em ^{57}Fe . Como é possível verificar, o número de átomos de ferro por molécula de proteína varia entre 4.8 e 8.3, sendo o valor médio igual a 6.5 ± 0.9 .

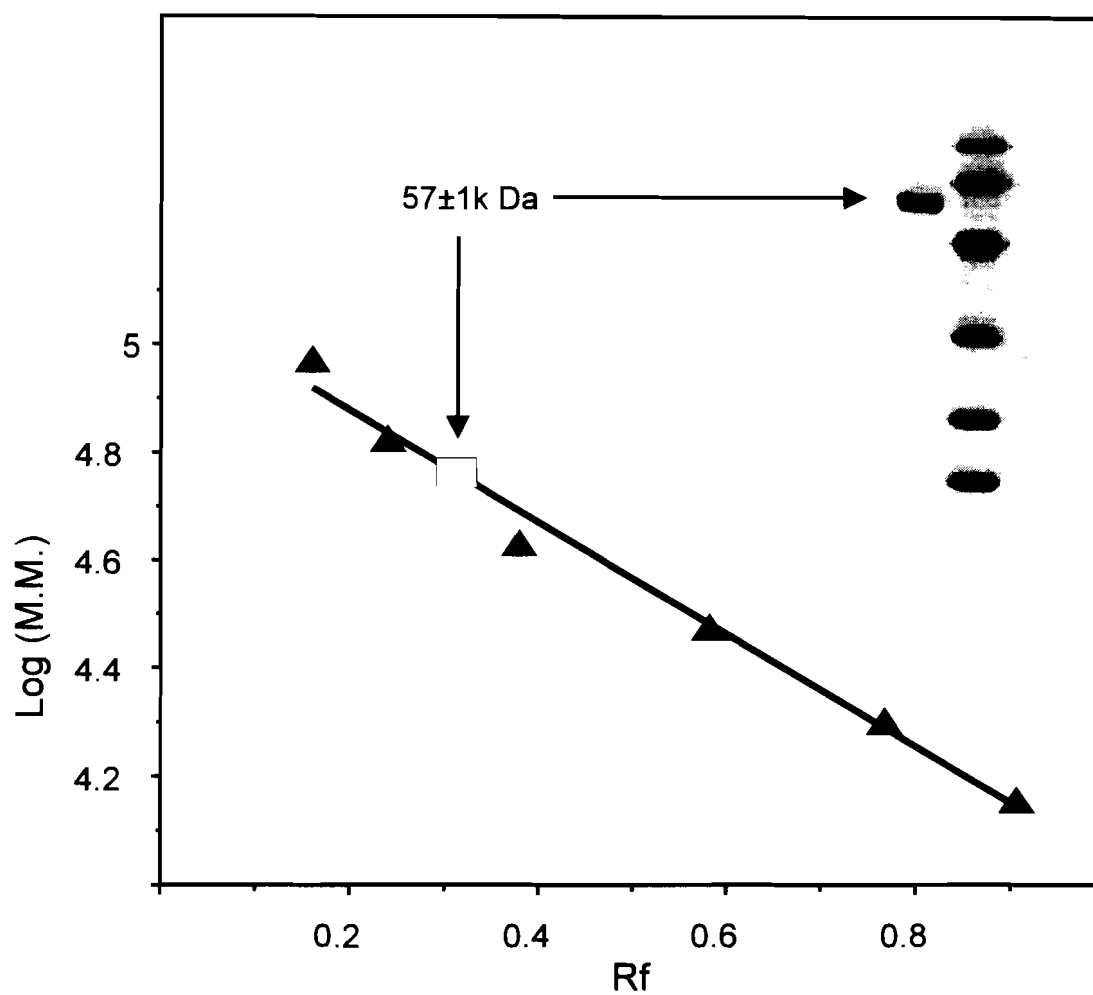


Figura VII.2 - Determinação da massa molecular da nova proteína de ferro-enxofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774 através de um gel de poliacrilamida (12.5%) na presença de 1% de SDS.

Tabela VII.2

Valores obtidos para diferentes determinações do conteúdo em ferro da nova proteína de ferro-enzofre.

Amostras		Método usado para a determinação da proteína	
		Lowry	Análise de ácidos aminados
Enriquecidas em ^{57}Fe	I	6.9	—
	II	6.1	—
	III	6.6	4.8
Sem enriquecimento	I	6.9	—
	II	8.3	—
	III	7.0	—
	IV	—	6.8
	V	5.5	6.4

VII.5. Determinação do enzofre lábil.

A quantificação do enzofre lábil presente nas amostras foi efectuada segundo o método de Fogo e Popowsky.²² Utilizando este método em combinação com o método de Lowry, para quantificação da proteína, obteve-se o valor de 6 ± 1 átomos de enzofre lábil por molécula de proteína.

VII.6. Determinação da composição em ácidos aminados.

A análise de ácidos aminados foi efectuada por hidrólise ácida, seguindo a metodologia descrita por Moore e Stein.²³ A quantificação das cisteínas foi efectuada após realização de uma oxidação perfórmica (ver apêndice A - Métodos). A composição de

Tabela VII.3

Composição de ácidos aminados da nova proteína isolada de D desulfuricans ATCC 27774. Comparação com a composição obtida através da sequência do gene que codifica para esta proteína em D desulfuricans ATCC 27774 e em D. vulgaris

Ácido aminado	D.d. 27774		D.v.
	Análise de a.a.	Sequência ⁵	Sequência ⁴
Asp + Asn	56	57	58
Tre	31	31	33
Ser	28	26	20
Glu + Gln	47	40	50
Gli	54	50	49
Ala	60	61	59
Cis	11-12	11	9
Val	38	39	41
Met	13	11	13
Ile	26	30	29
Leu	55	56	57
Tir	15	17	19
Fen	16	20	22
His	11	13	7
Lis	38-39	41	40
Arg	14	14	19
Pro	18	18	23
Trp	ND	5	5
Total de ácidos aminados	531-533	545	553
Massa molecular (Da)	57642-57992	58496	60161

ND - Não determinado.

ácidos aminados foi calculada tendo por base a massa molecular de 58 kDa. Os resultados obtidos são apresentados na tabela VII.3. Os resultados estão de acordo com a composição de ácidos aminados deduzida da sequência do gene desta proteína. Como seria de esperar, é também possível verificar que existe uma grande homologia com a composição derivada para a proteína isolada de *D. vulgaris* Hildenborough.

VII.7. Determinação do N-terminal.

A sequência dos primeiros 36 ácidos aminados foi efectuada com o auxílio de um sequenciador/analizador automático (Applied Biosystem 477A, Applied Biosystem 120A) baseado na degradação de Edman. A figura VII.3 mostra a comparação da sequência N-terminal determinada, com a derivada da sequência do gene da proteína de *D. vulgaris* Hildenborough. Como é possível observar, existe um desfasamento de três ácidos aminados no início da sequência. Para um alinhamento efectuado a partir da Met-4, verifica-se que existem 21 ácidos aminados idênticos. A homologia é particularmente acentuada em volta dos 4 resíduos de cisteína conservados em ambas as sequências. Este facto é particularmente significativo, pois estes resíduos são possíveis ligandos do ferro.

VII.8. Estudos espectroscópicos.

VII.8.1. Espectroscopia de UV-Visível.

O espectro de UV-visível da proteína, tal como foi isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774, está representado na figura VII.4. O espectro é bastante semelhante aos de proteínas que possuem agregados de ferro-enxofre, tais como as ferredoxinas e as hidrogenases. Este espectro possui máximos a 400, 305 e 280 nm, variando o valor do coeficiente de extinção molar, para a proteína, a 400 nm entre 25000 e 34000 M⁻¹cm⁻¹. Estes valores foram obtidos após a proteína ser quantificada através de análise de ácidos aminados ou pelo método descrito por Lowry.

	1			5			10			
<i>D.d.</i>	Met/Ser	Asn	Ala	Met	Fen	Cis	Tir	Gln	Cis	Gln
<i>D.v.</i>				Met	Fen	Cis	Fen	Gln	Cis	Gln
	11			15				20		
<i>D.d.</i>	Glu	Tre	Val	Gli	Asn	Lis	Gli	Cis	Tre	Gln
<i>D.v.</i>	Glu	Tir	Ala	Lis	Asn	Tre	Gli	Cis	Tre	Val
	21			25				30		
<i>D.d.</i>	Val	Gli	Val	Cis	Gli	Lis	Lis	Pro	Glu	Tre
<i>D.v.</i>	Lis	Gli	Met	Cis	Gli	Lis	Pro	Glu	Glu	Tre
	31			35						
<i>D.d.</i>	Ala	Ala	Leu	Gln	Asp	Ala				
<i>D.v.</i>	Ala	Asn	Leu	Gln	Asp	Leu				

Figura VII.3 - Comparação entre o N-terminal da nova proteína de ferro-enxofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774 (*D.d.*) com o N-terminal da proteína homóloga de *D. vulgaris* (*D.v.*) Hildenborough obtido a partir da sequência do respectivo gene.⁴ Os ácidos aminados idênticos encontram-se circundados por traços mais espessos. As substituições mais prováveis (de acordo com a matriz de substituição PAM250) são circundados por traços finos.

No entanto, o valor obtido para o coeficiente de extinção molar para o ferro é constante para as diversas determinações, tendo-se obtido o valor de $4700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Este facto parece indicar que, independentemente do método, a margem de erro na quantificação da proteína é grande. Uma possível explicação para estes resultados é a existência de quantidades variáveis de apoproteína nas amostras, obtendo-se portanto uma variação correspondente no coeficiente de extinção molar para a proteína.

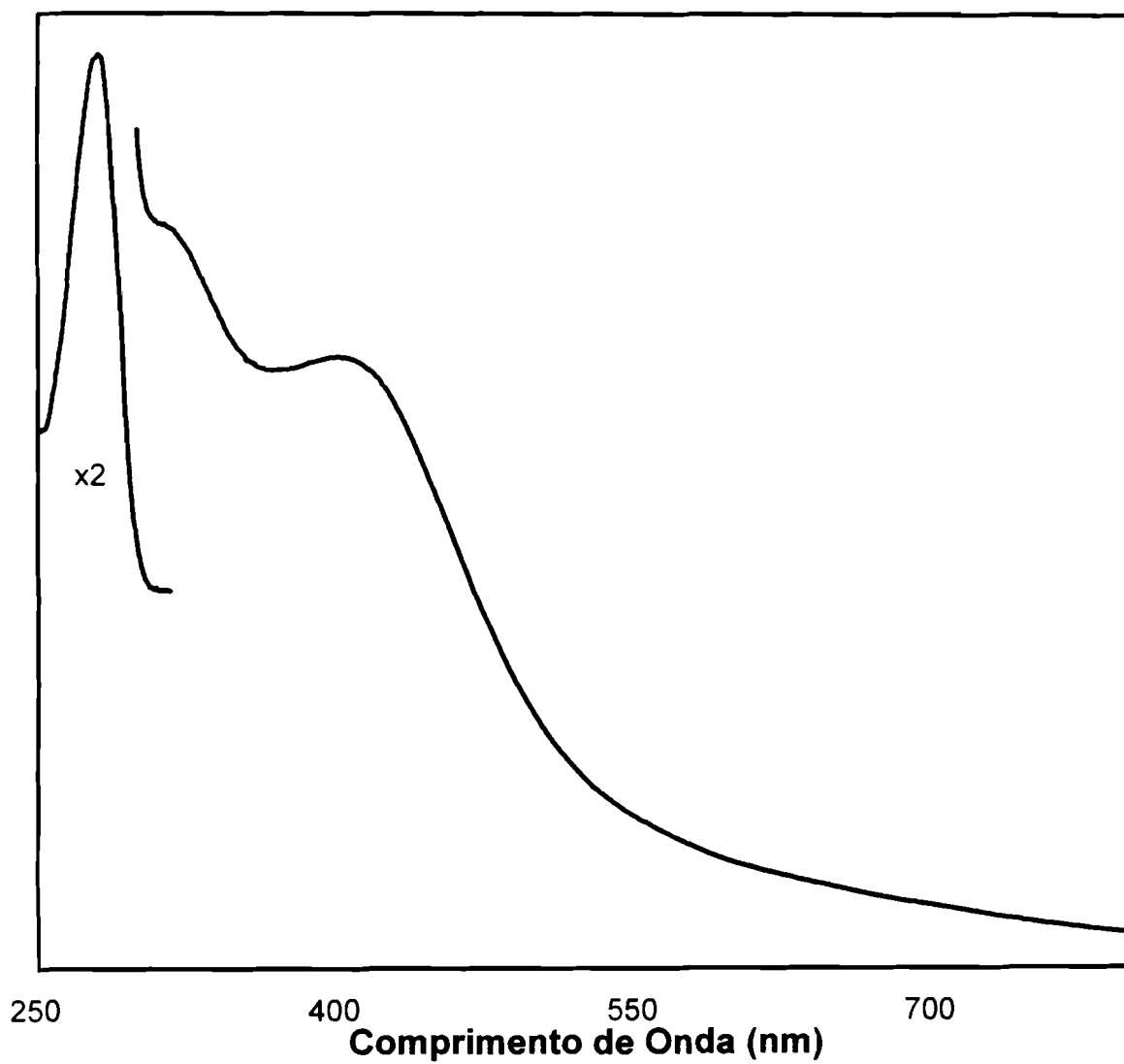


Figura VII.4 - Espectro de UV-visível da nova proteína de ferro-enzofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

VII.8.2. Espectroscopia de RPE.

A figura VII.5 contém os espectros da proteína tal como foi isolada. Os espectros foram obtidos aplicando uma potência de microonda igual a 2 mW a diversas temperaturas. São observadas diversas ressonâncias, contidas numa grande gama de valores do campo magnético (100 a 4100 gauss). Podemos descrever estas ressonâncias do seguinte modo: i) uma ressonância a campo baixo com $g = 15.3$; ii) um conjunto de ressonâncias na região compreendida entre $g = 9.8$ e $g = 5.4$; iii) um sinal de derivada a $g = 4.3$; iv) um outro grupo de ressonâncias em volta de $g = 2$.

Este último grupo de sinais pode ser atribuído a uma espécie com $S = 1/2$. Existem pelo menos dois conjuntos de valores de g que podem ser identificados. Assim, a temperaturas acima de 25 K, é possível obter um conjunto de ressonâncias a $g = 2.02$, 1.98 e 1.95 (ver figura VII.5d). A temperaturas mais baixas torna-se possível observar ressonâncias adicionais a $g = 1.97$, 1.94 e 1.90 (ver figura VII.5a-c). Após efectuar-se a quantificação de spin destes sinais, verificou-se que eles nunca correspondiam a mais do que 0.07 spins/molécula. Como veremos este resultado é coerente com as medidas efectuadas pela espectroscopia de Mössbauer, pois não foi detectada nenhuma espécie magnética fortemente dependente da direcção do campo magnético aplicado como seria de esperar para a espécie com $S = 1/2$ descrita.

O sinal de derivada a $g = 4.3$ é típico de Fe^{3+} adventício e, muito possivelmente, é devido à existência de uma pequena quantidade de impurezas presentes na amostra.

Todas as outras ressonâncias podem ser explicadas como fazendo parte do mesmo sistema de spin semi-inteiro. A figura VII.6 mostra a dependência teórica dos valores de g para o caso de vários valores de spin semi-inteiro. O valor de spin mais baixo para o qual se consegue obter um valor de g igual a 15.3 é $S = 9/2$. Para este caso existem cinco doubletos de Kramer. A tabela VII.4 mostra as energias desses doubletos e os valores de g esperados, calculados assumindo valores isotrópicos iguais a 2.0 para o tensor de g e com base no seguinte hamiltoneano de spin:

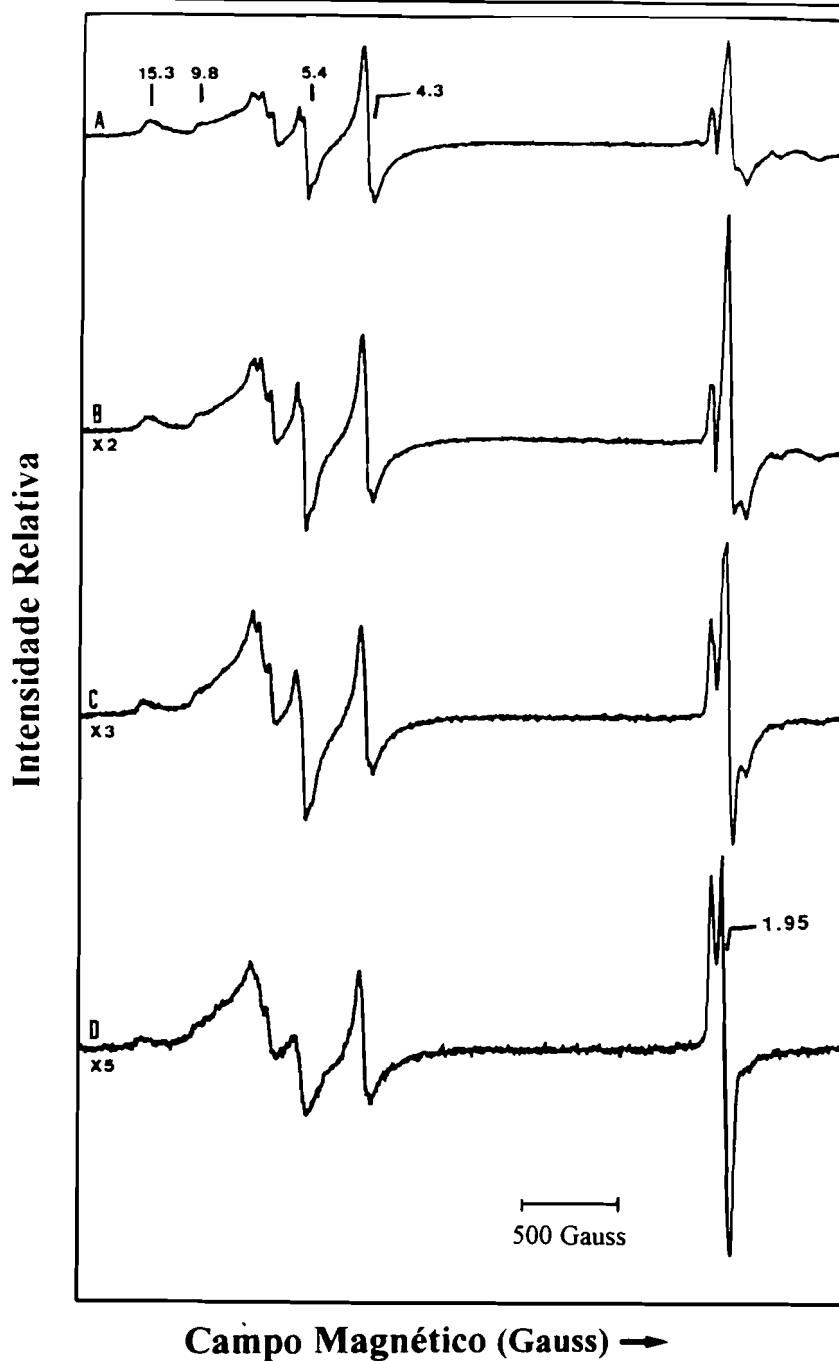


Figura VII.5 - Dependência de temperatura do espectro de RPE para a forma nativa da nova proteína de ferro-enxofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Os espectros foram obtidos às seguintes temperaturas: 4.5 (A), 7.5 (B), 16 (C) e 30 K (D). Outras condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.46 MHz; potência da micro-onda, 2 mW; amplitude de modulação, 10 gauss; ganho, 1.6×10^5 (A) e 1.0×10^5 (B, C e D).

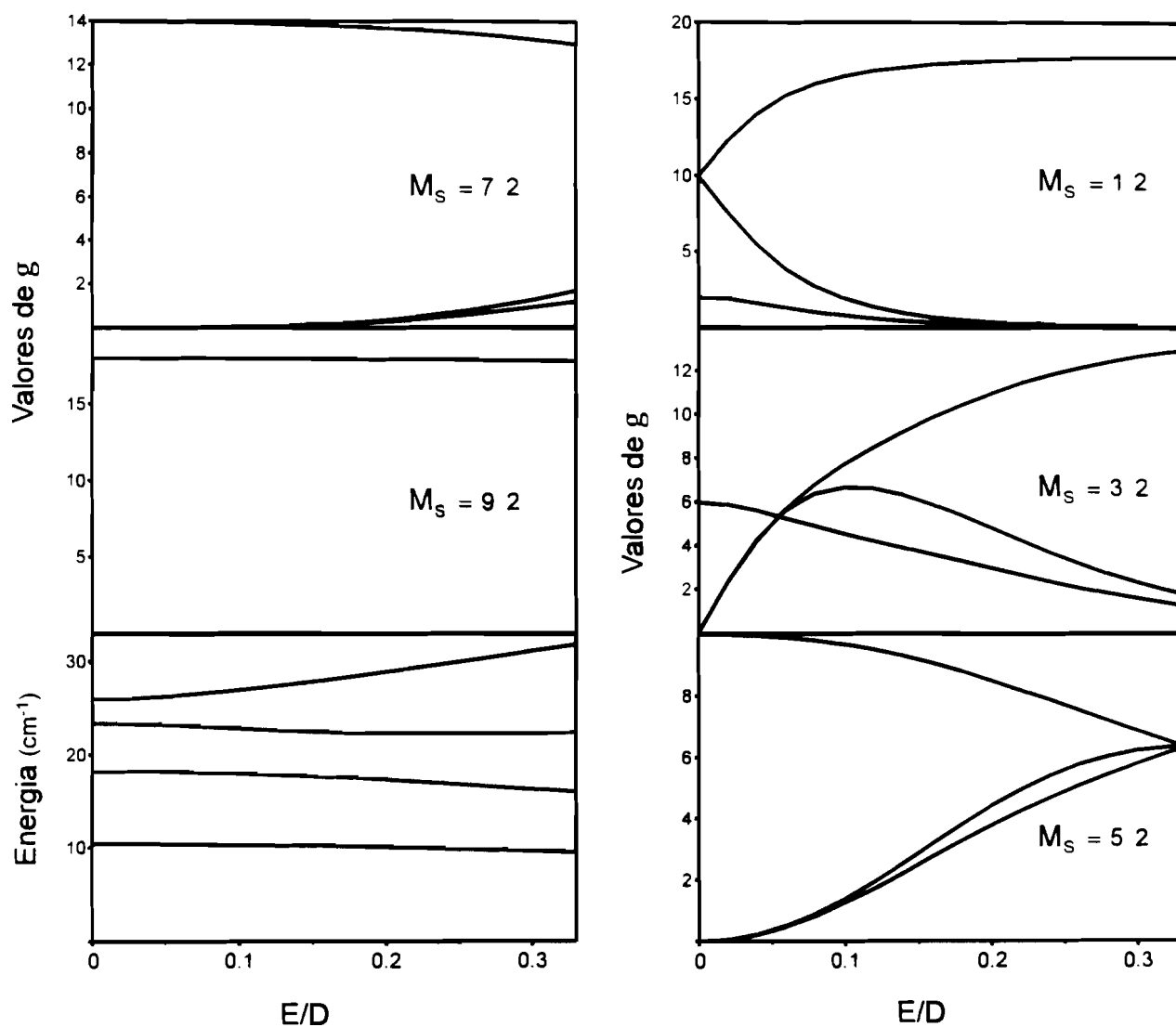


Figura VII.6 - Diagramas de g em função de E/D para um sistema com $S = 9/2$ e D negativo. Os valores das energias foram calculados para $D = -1.3 \text{ cm}^{-1}$.

Tabela VII.4

Energias e valores de g para os cinco dobletos de Kramer dum sistema com spin igual a $9/2$ e $E/D=0.062$.

M_S	Energia* (cm^{-1})	g_x	g_y	g_z
$\pm 1/2$	26.4	3.72	15.3	1.31
$\pm 3/2$	23.1	5.73	5.80	5.22
$\pm 5/2$	18.1	0.54	0.51	9.89
$\pm 7/2$	10.4	0.01	0.01	13.97
$\pm 9/2$	0.0	0.0	0.0	18.0

* Valores calculados com base no valor de D estimado pela análise dos dados de Mössbauer ($D = -1.3 \text{ cm}^{-1}$).

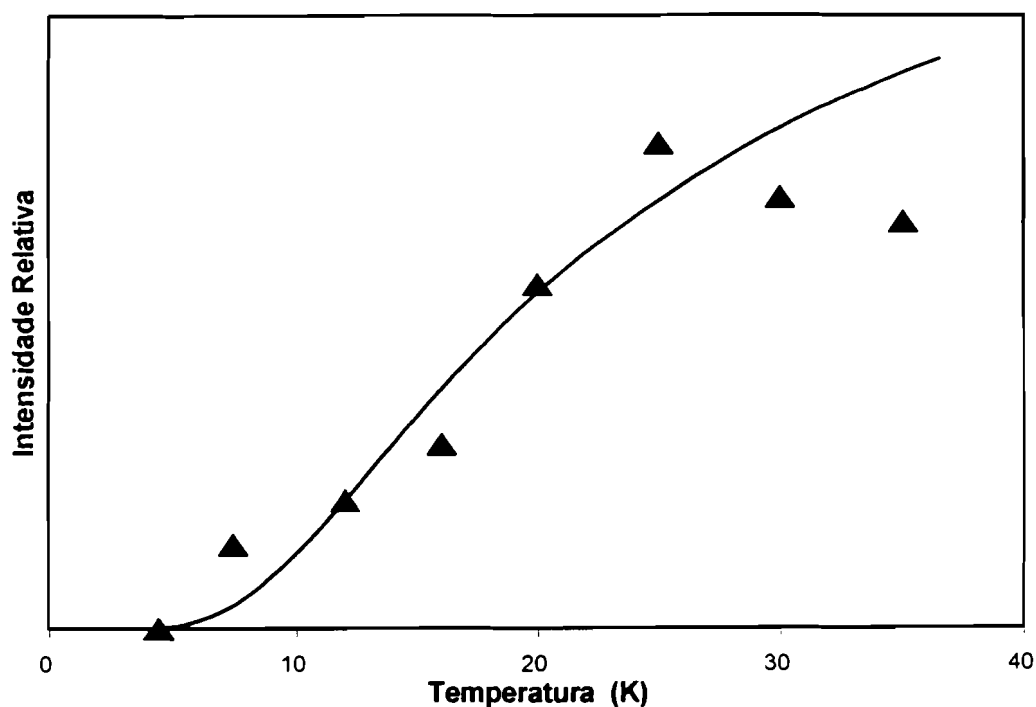


Figura VII.7 - Variação da intensidade do sinal a $g = 15.3$, presente na amostra nativa, em função da temperatura. A linha sobreposta aos pontos experimentais representa a evolução da fracção populacional com a temperatura para o doubleto de Kramer com $M_S = \pm 1/2$ (cálculos baseados nos valores de energia da tabela VII.4).

$$\hat{H}_e = D \left[S_z^2 - \frac{S(S+1)}{3} + \left(\frac{E}{D} \right) (S_x^2 - S_y^2) \right] + \beta \vec{S} \cdot \vec{g} \cdot \vec{H}$$

Baseados nesta análise, podemos atribuir a ressonância a $g = 15.3$ ao dobleto de Kramer de energia mais elevada ($M_S = \pm 1/2$). Este mesmo facto pode ser confirmado pela variação da intensidade do sinal com a temperatura (ver figura VII.7), estudos esses que indicam claramente que o sinal provém de um estado excitado e, portanto, que o valor de D terá que ser negativo.

As ressonâncias compreendidas entre $g = 9.8$ e 5.4 são originárias dos dobletos de Kramer com $M_S = \pm 3/2, \pm 5/2$ e $\pm 7/2$. Por sua vez, a ressonância proveniente do dobleto de Kramer de mais baixa energia ($g_Z = 18.0, M_S = \pm 9/2$) não é observada devido à probabilidade dessa transição ser aproximadamente nula ($g_X = g_Y = 0$).

Por adição de viologénio de metilo reduzido com hidrogenase/ H_2 obtém-se o espectro da figura VII.8a. Este espectro apresenta várias alterações, sendo as mais significativas as seguintes: i) o aumento da intensidade a $g = 15.3$; ii) o desaparecimento, quase total, das ressonâncias entre $g = 9.8$ e 5.4 . Na figura VII.8b mostra-se o espectro da mesma amostra adquirido com o campo da micro-onda paralelo ao da radiofrequência. Como é possível observar todas as ressonâncias são anuladas, com a excepção da ressonância a $g = 15.3$ cuja intensidade aumenta. Este comportamento é típico de um estado de spin inteiro. Uma possível explicação para estas observações é a de que agora a amostra se encontre parcialmente reduzida. A espécie que originava as ressonâncias correspondentes a um spin igual a $9/2$ foi reduzida por um electrão a uma espécie com spin inteiro, espécie essa que origina uma nova ressonância com um valor de g muito semelhante ao $g = 15.3$ presente na amostra nativa. Outra indicação de que estamos na presença de um sinal distinto do observado para a amostra nativa é dada pela dependência de temperatura deste novo sinal. Como é possível observar na figura VII.8, a intensidade do sinal decresce com o aumento da temperatura, comportamento contrário ao observado para o sinal da amostra nativa (ver figura VII.7).

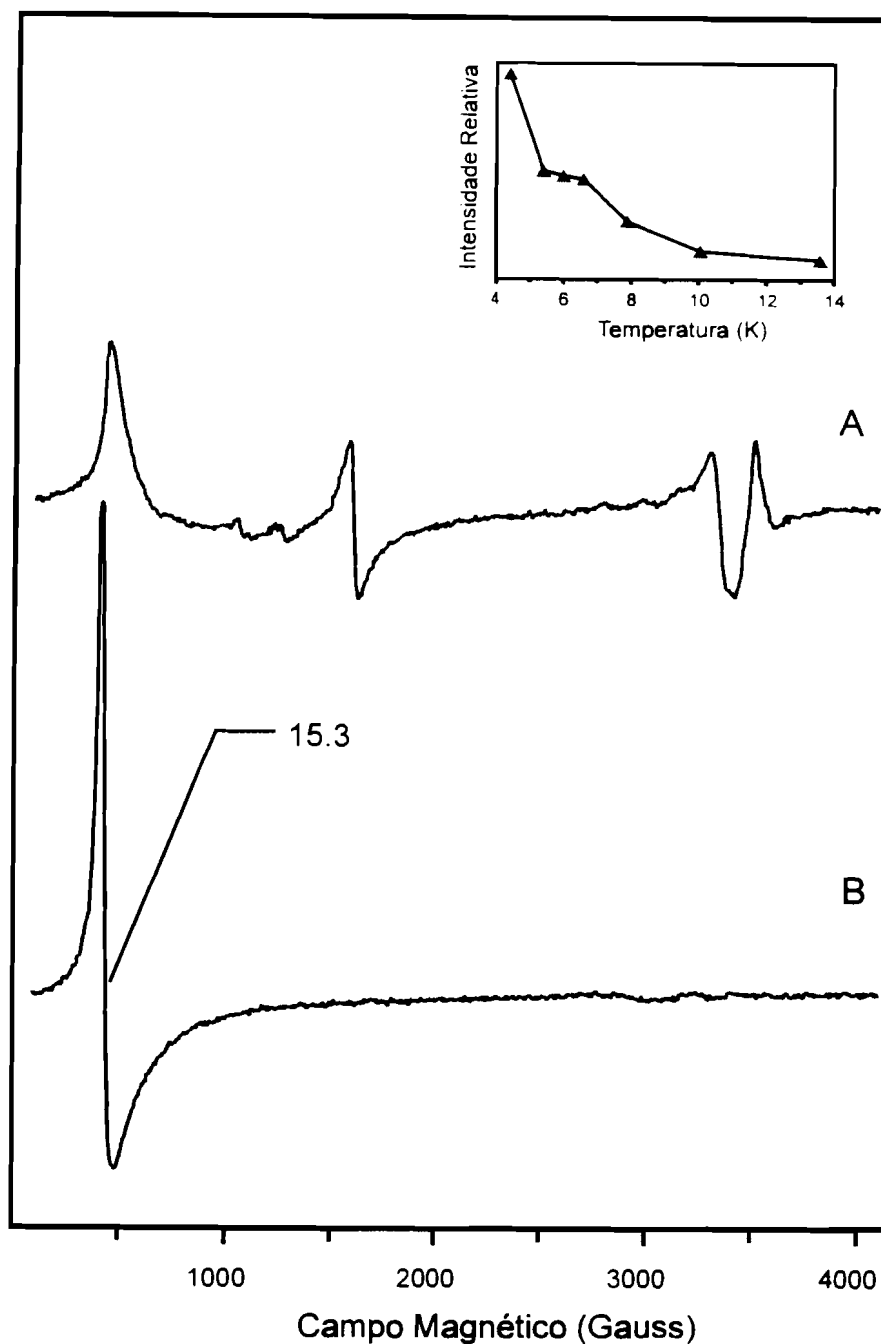


Figura VII.8 - Espectro de RPE da nova proteína de ferro-enxofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774 após redução com metilo de viologénio. (A) modo perpendicular (\perp); (B) modo paralelo (\parallel). Outras condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.374 (\parallel) e 9.638 (\perp) MHz; potência da micro-onda, 6.2 mW; amplitude de modulação, 9.01 gauss; ganho, 8.0×10^4 . No canto superior direito apresenta-se a dependência de temperatura do sinal a $g = 15.3$ (espectro A).

A amostra pode ser totalmente reduzida quimicamente, por adição de ditionito de sódio, ou enzimaticamente por incubação da proteína com a hidrogenase isolada de *D. vulgaris* na presença de H_2 .

A figura VII.9 contém vários espectros da proteína reduzida, adquiridos a diferentes temperaturas com a potência de micro-onda igual a 2 mW. O espectro de RPE apresenta várias ressonâncias a campo alto originárias de um sistema com $S = 1/2$. Para temperaturas superiores a 15 K o espectro é dominado por um sinal rômbico intenso, com os seguintes valores de g , 2.00, 1.83 e 1.31. Da quantificação de spin deste sinal obtém-se um valor aproximadamente igual 0.8 spins/molécula. A temperaturas mais baixas podem ser observadas ressonâncias adicionais a $g = 1.72$ e 1.53. A 4.5 K o sinal torna-se bastante complexo, observando-se um desdobramento do pico a $g = 2.00$. A separação entre picos é neste caso igual a 2.4 mT. Estes resultados sugerem a possibilidade de interacção entre a espécie de $S = 1/2$ (da qual resulta o sinal rômbico) com outro centro paramagnético espacialmente próximo. Dependências de temperatura semelhantes foram já observadas para o sinal do níquel C de várias hidrogenases, nas quais foi postulada a interacção do centro de níquel com um agregado (do tipo $[4Fe-4S]^{1+}$) espacialmente próximo.^{24,25}

Para além dos sinais acima descritos, a amostra totalmente reduzida contém ainda outro tipo de ressonâncias. Assim, a temperaturas inferiores a 7 K pode ser observado um sinal alargado aproximadamente a $g = 4.7$. Com o incremento da temperatura, ocorre o aparecimento de uma nova ressonância a $g = 5.34$. Estes valores de g , bem como a dependência de temperatura estão de acordo com um sistema de spin com $S = 3/2$, D positivo, $E/D = 0.23$ e com um valor isotrópico para g intrínseco igual a 1.87 (ver tabela VII.5).

De modo a estimar os potenciais das espécies de RPE observadas, foram efectuadas várias titulações potenciométricas. Nestas titulações utilizaram-se como titulantes viologénio de metilo reduzido com hidrogenase/ H_2 ou ditionito de sódio (ver apêndice A - Métodos). Duas dessas titulações encontram-se representadas nas figuras VII.10 e VII.11. Os resultados obtidos parecem indicar que ao decréscimo de intensidade das ressonâncias a $g = 6.5$, 6.2 e 5.4 corresponde o aumento da nova ressonância a $g = 15.3$. O valor estimado, segundo um

comportamento de Nernst, para o potencial de oxidação-redução correspondente é de 60 ± 20 mV. Este resultado é consistente com os resultados anteriormente descritos, reforçando o argumento que a nova espécie é originada pela redução monoelectrónica do estado nativo.

A curva de titulação da ressonância a $g = 15.3$ apresenta a forma de um sino, sendo possível estimar o valor de -115 ± 20 mV para o potencial de oxidação-redução correspondente ao desaparecimento deste sinal.

Para além destes potenciais, foram ainda estimados os valores de -160 ± 15 e -260 ± 15 mV para os potenciais de oxidação-redução das espécies associadas, respectivamente, às ressonâncias a $g = 4.7$ e 1.83 .

Tabela VII.5

Energias e valores de g para os doubletos de Kramer de um sistema com spin igual a $3/2$ †.

M_S	g_x	g_y	g_z
$\pm 1/2$	2.41	4.81	1.60
$\pm 3/2$	1.33	1.07	5.34

†Valores usados para o cálculo: $D > 0$, $E/D = 0.23$
e $g_0 = 1.87$

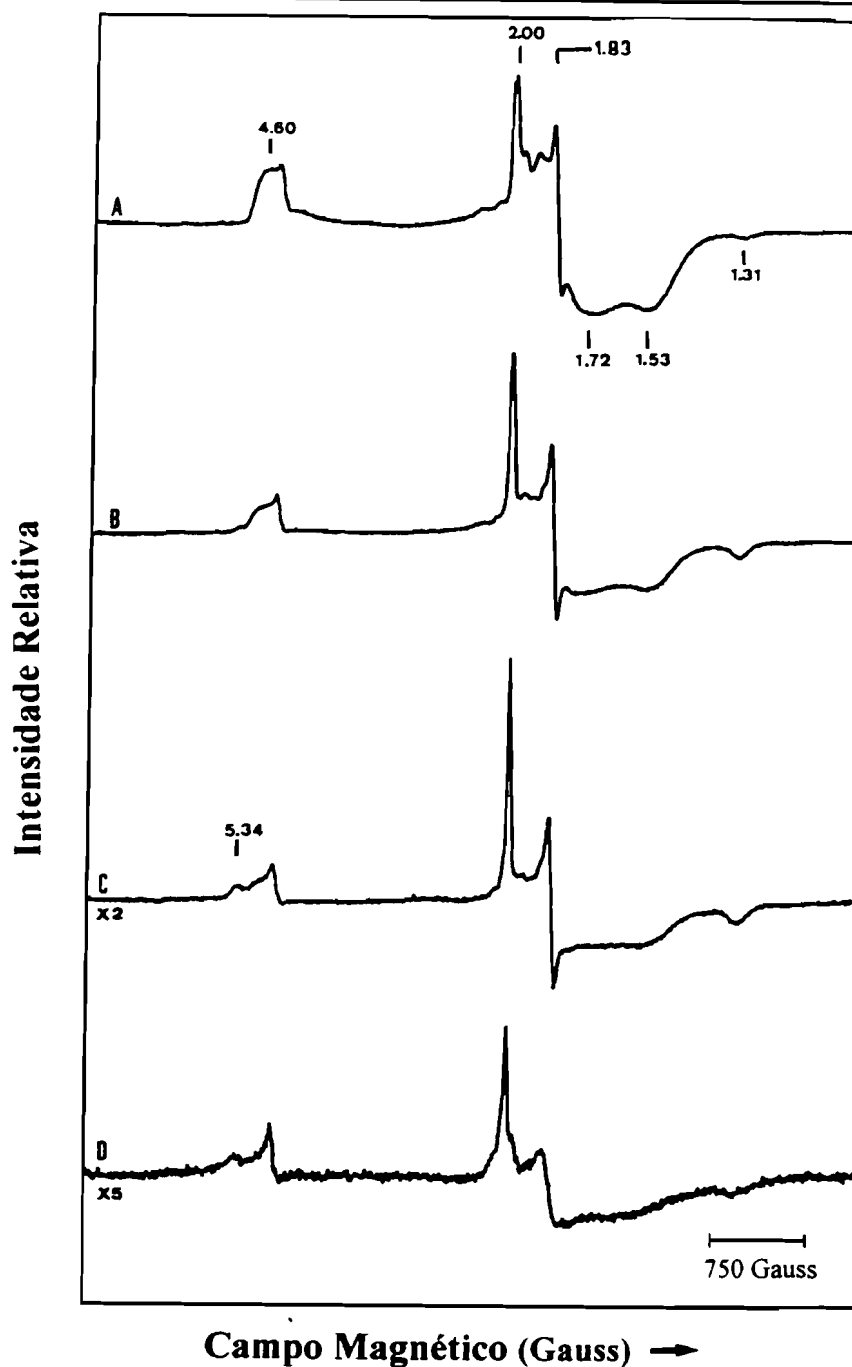


Figura VII.9 - Dependência de temperatura do espectro de RPE para a forma totalmente reduzida da nova proteína de ferro-enzofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Os espectros foram obtidos às seguintes temperaturas: 4.5 (A), 7.5 (B), 16 (C) e 30 K (D). Outras condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.46 MHz; potência da micro-onda, 2 mW; amplitude de modulação, 10 gauss; ganho, 4×10^4 .

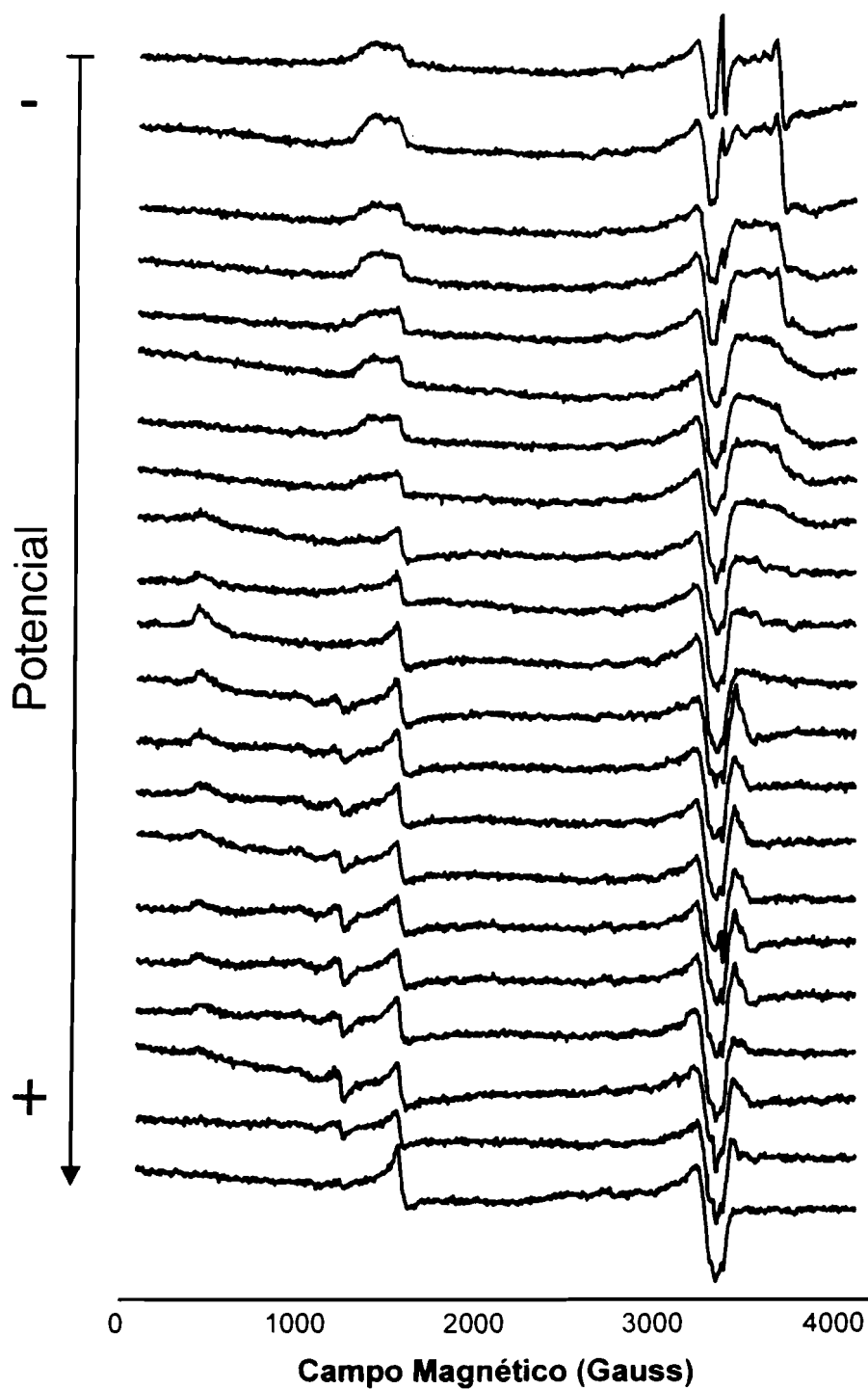


Figura VII.10 - Espectros de RPE obtidos a diferentes potenciais. Variação entre 300 e -500 mV, obtida por adição de alíquotas de uma solução de ditionito de sódio. Condições experimentais: temperatura, 4.4 K; frequência da micro-onda, 9.43 MHz; potência da micro-onda, 2.34 mW; amplitude de modulação, 10.3 gauss; ganho, 3.2×10^5 .

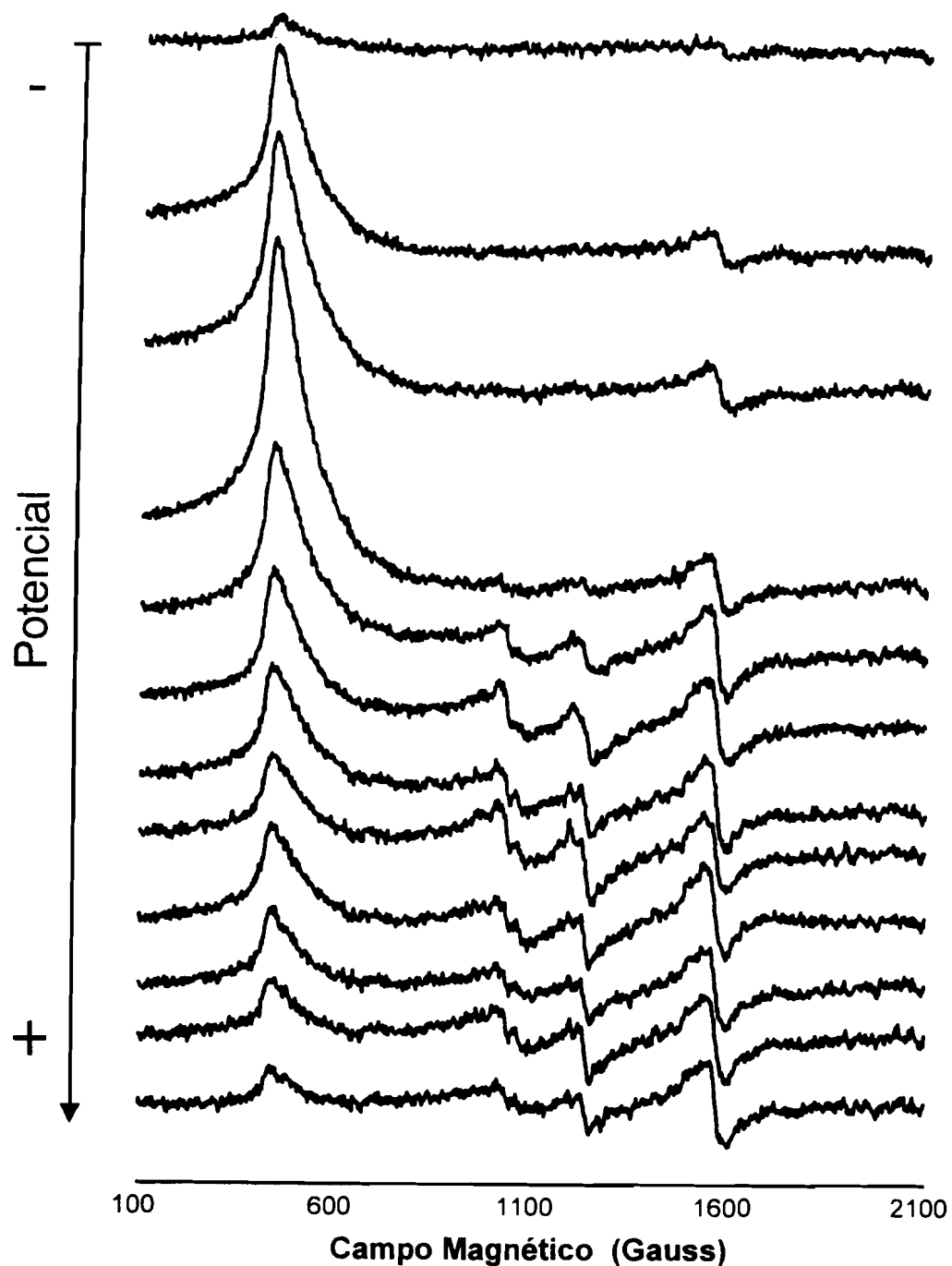


Figura VII.11 - Espectros de RPE obtidos a diferentes potenciais. Variação entre 70 e -180 mV, obtida por adição de alíquotas de uma solução de viologénio de metilo reduzido com hidrogenase/H₂. Condições experimentais: temperatura, 4.4 K; frequência da micro-onda, 9.44 MHz; potência da micro-onda, 5.9 mW; amplitude de modulação, 10.3 gauss; ganho, 1.6×10^5 .

VII.8.3. Espectroscopia de Mössbauer.

Na figura VII.12a mostra-se o espectro obtido para a amostra no estado em que foi isolada, a 1.5 K e com um campo magnético aplicado paralelamente aos raios γ , igual a 0.5 kG. Neste espectro é possível distinguir duas componentes com aproximadamente a mesma intensidade. No centro do espectro existe um dobleto de quadrupolo com $\Delta E_Q = 1.20$ mm/s e $\delta = 0.46$ mm/s. Apesar destes parâmetros serem característicos de iões férricos de spin alto ($S = 5/2$) os dados obtidos na presença de um campo magnético aplicado alto (ver figura VII.12b) revelam que o dobleto é originário de uma espécie diamagnética ($S = 0$). Tal facto sugere que o dobleto provém de um agregado, no qual os átomos de ferro paramagnético encontram-se acoplados antiferromagneticamente para dar origem à espécie diamagnética.

A outra espécie presente é uma espécie magnética com picos de absorção, bastante bem resolvidos, compreendidos entre -7.0 e 8.0 mm/s. Verifica-se, portanto, que o desdobramento magnético total é significativamente grande (a um desdobramento igual a 15 mm/s corresponde um campo efectivo igual a 466 kG), ainda que na presença de um pequeno campo magnético aplicado (0.5 kG). Esta observação parece indicar que esta espécie magnética provém de um sistema de spin semi-inteiro. Outra observação interessante é que, tal como se mostra na figura VII.12b, o espectro é independente da orientação do campo magnético aplicado relativamente à radiação γ . Estamos assim na presença de um sistema uniaxial, ou seja um sistema em que $g_{//} \gg g_{\perp}$. Este facto é bastante importante para a análise desta componente magnética, por se verificar que o espectro de Mössbauer associado a um sistema do tipo referido ser constituído por seis linhas com intensidades relativas de 3:2:1:1:2:3 (ver figura VII.13). Assim, a componente magnética deve pertencer a pelo menos um agregado, pois contém mais do que seis picos de absorção. O pico observado a -7.0 mm/s deve corresponder ao pico A do espectro da figura VII.13, espectro esse que provém de um dos sítios do agregado. Como a absorção estimada para o referido pico é 2.0%, o total de absorção correspondente ao espectro deste sítio é aproximadamente igual a 8%.

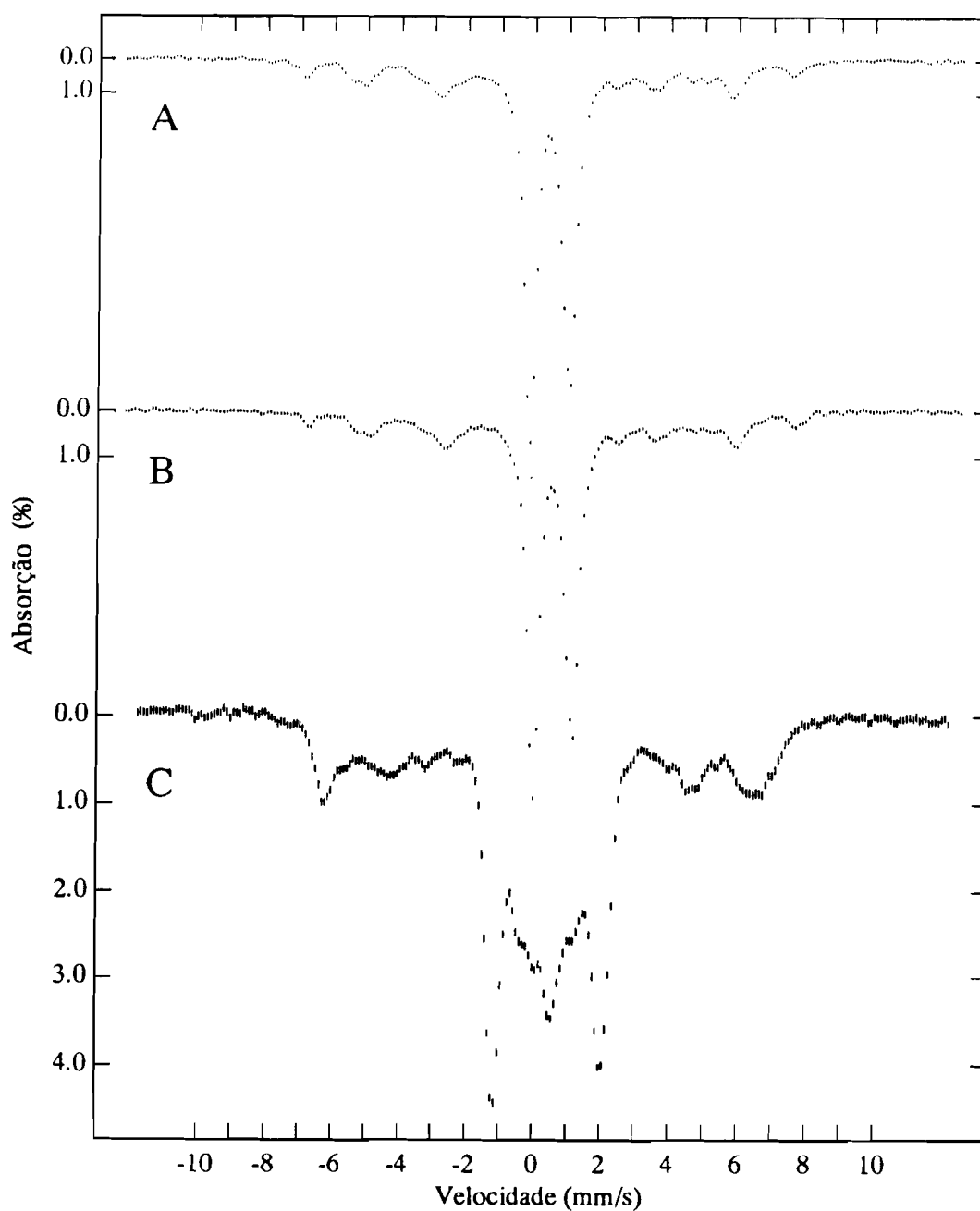


Figura VII.12 - Espectros de Mössbauer da forma nativa da nova proteína de ferro-enxofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Os espectros foram adquiridos a 4.2 K e nas seguintes condições: (A) campo paralelo à radiação γ , 0.5 kG; (B) campo perpendicular à radiação γ , 0.5 kG e (C) campo paralelo à radiação γ , 80 KG.

Considerando este dado, e sabendo que a componente magnética contém aproximadamente metade da absorção total do espectro, é lícito pensar que ela é constituída por seis sítios diferentes. Assim, a componente magnética pode ser atribuída a um único agregado de seis ferros, ou alternativamente a dois agregados de três ferros. Como veremos de seguida, a prova de que apenas a primeira destas hipóteses é correcta pode ser obtida do espectro da proteína adquirido a temperatura elevada.

O espectro da figura VII.14 foi adquirido a 140 K na ausência de campo magnético aplicado. A esta temperatura o tempo de relaxação do spin electrónico é pequeno, o que implica que a espécie magnética presente a temperaturas baixas colapse em dobletos de quadrupolo. A grande maioria destes novos dobletos de quadrupolo vão possuir parâmetros semelhantes aos do dobleto de quadrupolo central presente no espectro adquirido a temperaturas baixas. No entanto, existe um pico bem resolvido situado a +2.44 mm/s. Após ser efectuado um ajuste do espectro assumindo três diferentes dobletos de quadrupolo, é possível verificar que esse pico corresponde a uma das linhas de um dobleto de quadrupolo com os seguintes parâmetros: $\Delta E_Q = 2.67$ mm/s e $\delta = 1.09$ mm/s. Estes parâmetros são típicos de um ião ferro no estado ferroso de spin alto. O elevado valor de desvio isomérico é uma indicação de que este ferro não possui uma esfera de coordenação tetraédrica de enxofres, sendo consistente com um ferro penta ou hexacoordenado por ligandos contendo azotos e/ou oxigénios. Um dado importante é que este dobleto de quadrupolo corresponde a $8 \pm 1.4\%$ da absorvância total, valor que pode ser determinado correctamente uma vez que a linha de mais alta energia se encontra individualizada. Esta percentagem é idêntica à obtida do espectro a baixa temperatura para um dos ferros da componente magnética. Se essa componente fosse devida a dois agregados de três ferros, então o dobleto não deveria conter 8% mas sim 16% da absorvância total. Para além disto, não é possível acoplar um ferro ferroso com dois ferros férricos e obter uma espécie com spin semi-inteiro.

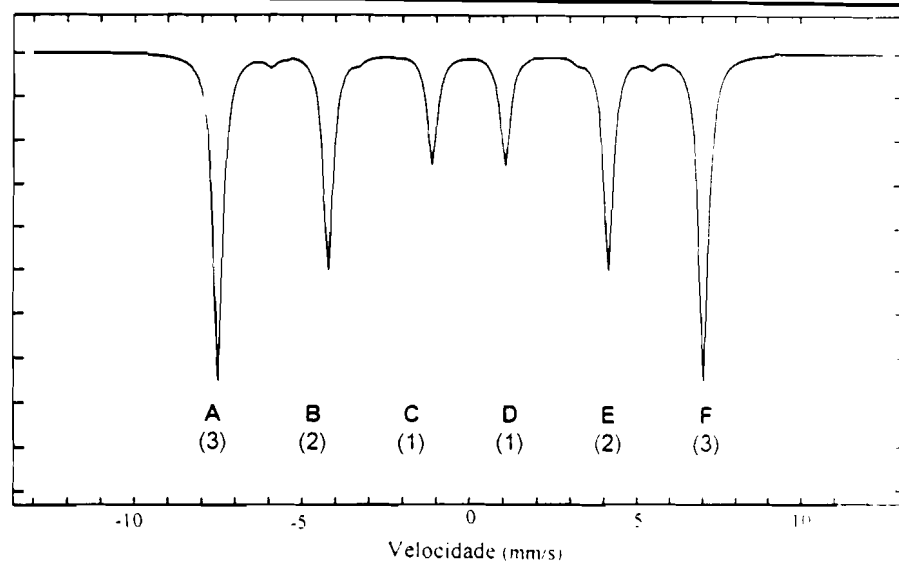


Figura VII.13 - Espectro de Mössbauer típico de um sistema uniaxial ($g_{//} \gg g_{\perp}$).

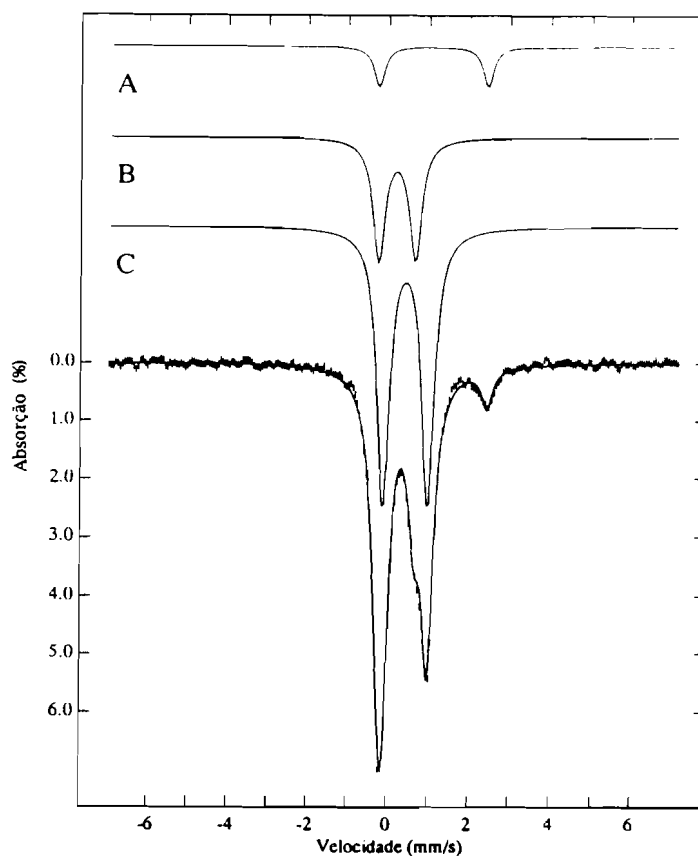


Figura VII.14 - Espectro de Mössbauer da forma nativa da nova proteína de ferro-enxofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Espectro adquirido a 140 K, na ausência de campo magnético externo. A linha sobreposta ao espectro experimental representa a soma dos dubletos de quadrupolo representados no topo do espectro (8% de A, 28% de B e 64% de C).

Os outros dois doubletos de quadrupolo resultantes do ajuste possuem os seguintes parâmetros: i) $\Delta E_Q = 1.09$ mm/s e $\delta = 0.42$ mm/s e ii) $\Delta E_Q = 0.90$ mm/s e $\delta = 0.21$ mm/s. A intensidade de absorção é, respectivamente, igual a $64 \pm 3\%$ e $28 \pm 2\%$. O primeiro destes doubletos tem parâmetros muito semelhantes aos obtidos para o doubleto de quadrupolo observado a 1.5 K, sendo portanto associado ao agregado diamagnético. No entanto a sua percentagem de absorção é superior a 50%, o que indica que parte dos ferros constituintes do agregado paramagnético também contribuem para este doubleto. É importante salientar que a parte central do espectro adquirido a 140 K corresponde à sobreposição de diversos doubletos de quadrupolo, e que o ajuste feito assumindo apenas três doubletos individualizados corresponde a uma aproximação simples. Esta aproximação não pode ser assumida como uma solução única, mas uma hipótese de trabalho que nos permite fazer algumas observações pertinentes. Deste modo, podemos verificar que a absorção atribuída ao segundo doubleto corresponde aproximadamente a três sítios férricos com parâmetros consistentes com uma coordenação tetraédrica de enxofres. Assim, e após correlacionar os dados obtidos às diferentes temperaturas, podemos concluir que a componente magnética é devida a um agregado contendo seis ferros, cinco dos quais no estado férrico e um deles no estado ferroso.

Com base nas observações feitas, podemos agora tentar a desconvolução, em seis sítios, da componente magnética. Para isso foram adquiridos espectros a 4.2 K e a diferentes campos magnéticos (ver figura VII.15). As análises foram efectuadas utilizando um hamiltoneano de spin semelhante ao referido na secção de RPE, mas ao qual foram adicionados os seguintes termos:

$$\vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} + \left(\frac{eQV_z}{4} \right) \left[I_z^2 - \frac{I(I+1)}{3} + \frac{\eta}{3} (I_x^2 - I_y^2) \right] - g_n \beta_n \vec{H} \cdot \vec{I}$$

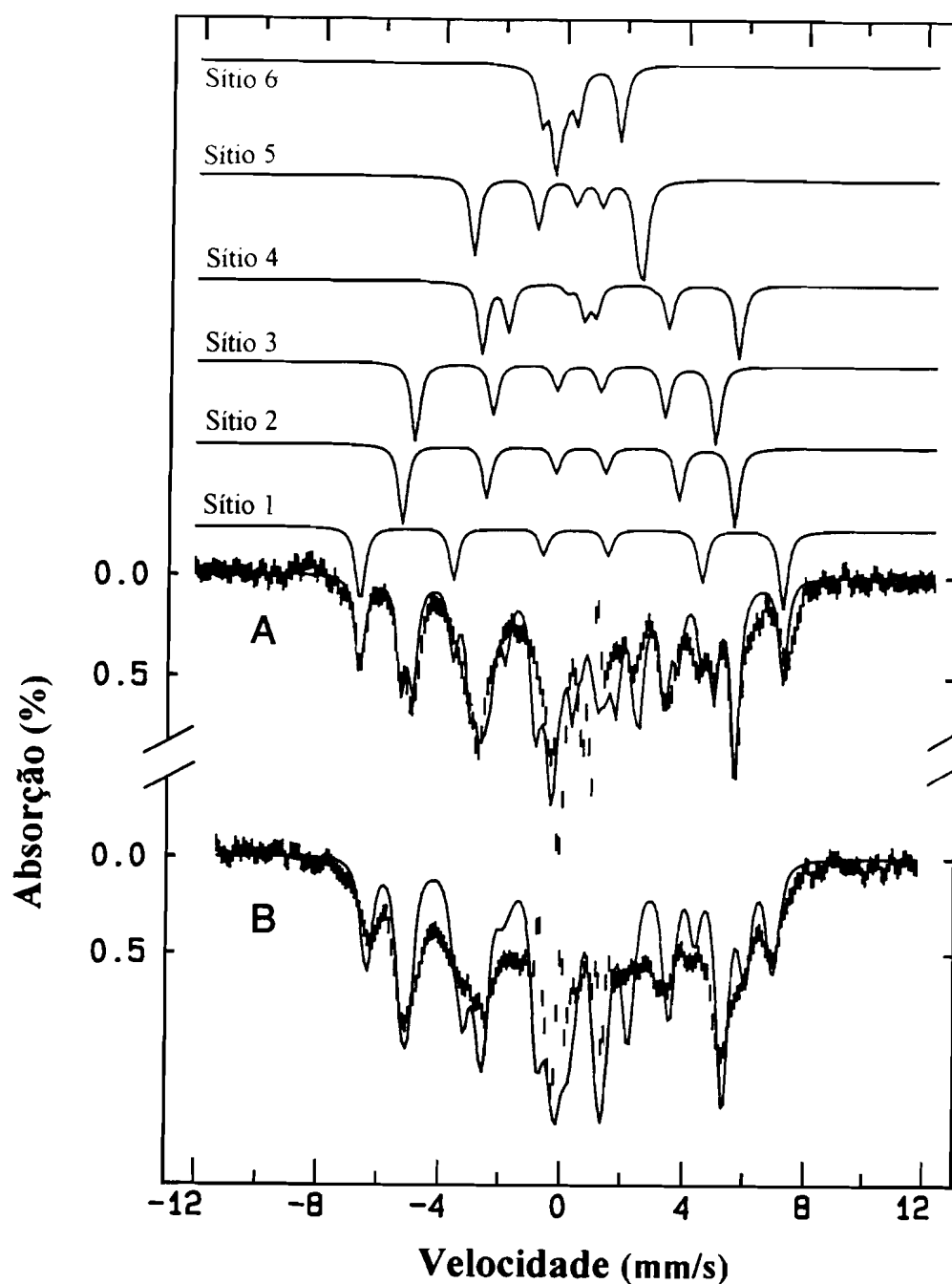


Figura VII.15 - Espectros de Mössbauer da forma nativa da nova proteína de ferro-enzofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774 após subtração do dubleto de quadrupolo central (espécie diamagnética). Os espectros foram adquiridos a 1.5 K na presença de um campo magnético aplicado de 0.5 kG (A) e a 4.2 K na presença de um campo magnético aplicado de 30 kG (B). No topo do espectro apresentam-se as simulações obtidas (usando os parâmetros listados na tabela VII.6) para os seis diferentes sítios do agregado I.

Todos os sítios partilham o mesmo estado electrónico, ou seja o sistema tem um único valor de D , E/D e S . No entanto os tensores \tilde{A} (acoplamento hiperfino) e \tilde{V} (gradiente de campo eléctrico) são característicos de cada sítio. Tendo por base os dados obtidos por RPE, podemos atribuir a este sistema o spin $S = 9/2$ e o valor de E/D igual a 0.062. Assumindo este valor de E/D , os valores das constantes de acoplamento hiperfino podem ser estimados a partir do espectro obtido a 1.5 K e 0.5 kG e o valor de D pode ser avaliado através da análise dos dados recolhidos aos diversos campos magnéticos. Finalmente, os valores para os desvios isomérico e para os desdobramentos de quadrupolo podem ser estimados pelo espectro obtido a 140 K. A desconvolução foi efectuada através de sucessivas tentativas nas quais se tentou simular os diferentes picos de absorção, sendo bastante importante o facto de eles se encontrarem bem resolvidos para a maioria dos sítios.

A figura VII.15 mostra as simulações obtidas e a tabela VII.6 contém os valores obtidos para os parâmetros dos seis diferentes sítios. Após a atribuição dos três primeiros sítios, facilitada pelo facto dos picos estarem bem individualizados, existem apenas quatro diferentes possibilidades de emparelhar os dois conjuntos de δ e ΔE_Q restantes. A atribuição efectuada foi a única que concordava com os dados experimentais obtidos aos diferentes valores de campo magnético aplicado. Os parâmetros para o sexto sítio, contrariamente aos outros, não podem ser estimados com precisão, pois o espectro magnético deste sítio não se encontra resolvido do dobleto de quadrupolo central. Assim, a atribuição foi feita apenas com base na análise da intensidade restante.

As simulações obtidas reproduzem bem os dados experimentais, sendo possível extrair algumas conclusões importantes. Cada um dos sítios contribui com 8% para o total da absorvância. Da análise dos parâmetros da tabela VII.6 é possível verificar que a um dos sítios teve de ser atribuído um valor elevado para o desvio isomérico, típico de um ferro ferroso de spin alto. Esta observação está de acordo com os dados obtidos a 140 K. Normalmente, nos casos de ferros ferrosos de spin alto, o tensor A é anisotrópico. No entanto neste caso, foi assumido um valor isotrópico para o tensor A pois trata-se de um sistema uniaxial e o espectro é apenas sensível ao valor de A segundo o eixo uniaxial. Outra observação que pode

ser efectuada é a de que os valores de A obtidos apresentam sinais opostos, o que está de acordo com a existência de um acoplamento antiferromagnético neste agregado.

Tabela VII.6

Parâmetros hiperfinos usados para simular os seis sítios do agregado paramagnético obtido a 1.5 K.

Sítio	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	η	$A/g_n\beta_n$ (kG)
1	-1.0	0.40	8.5	-100
2	-1.0	0.40	3.0	-78
3	-1.0	0.27	3.0	+70
4	+2.67	1.15	5.0	+55
5	-1.0	0.27	0	-40
6	+1.0	0.27	0	-15

Outros parâmetros utilizados: $S = 9/2$, $D = -1.3 \text{ cm}^{-1}$, $E/D = 0.062$ e $\Gamma = 0.35 \text{ mm/s}$

A componente diamagnética do espectro poderia ser explicada como pertencendo a um diferente estado de oxidação do agregado que dá origem à componente magnética. Se assim fosse, após a purificação a proteína seria constituída por uma mistura de igual quantidade de dois estados de oxidação. Isto significaria que o potencial da solução estaria muito próximo do potencial de meia onda do agregado. Nesta situação, e de acordo com um comportamento de Nernst, uma mudança de 60 mV no potencial terá como efeito a variação de cerca de 90% na população destas espécies. Como veremos de seguida, a análise de amostras em diferentes estados de oxidação contraria esta hipótese. Resta portanto a possibilidade de a componente diamagnética estar associada a um segundo agregado.

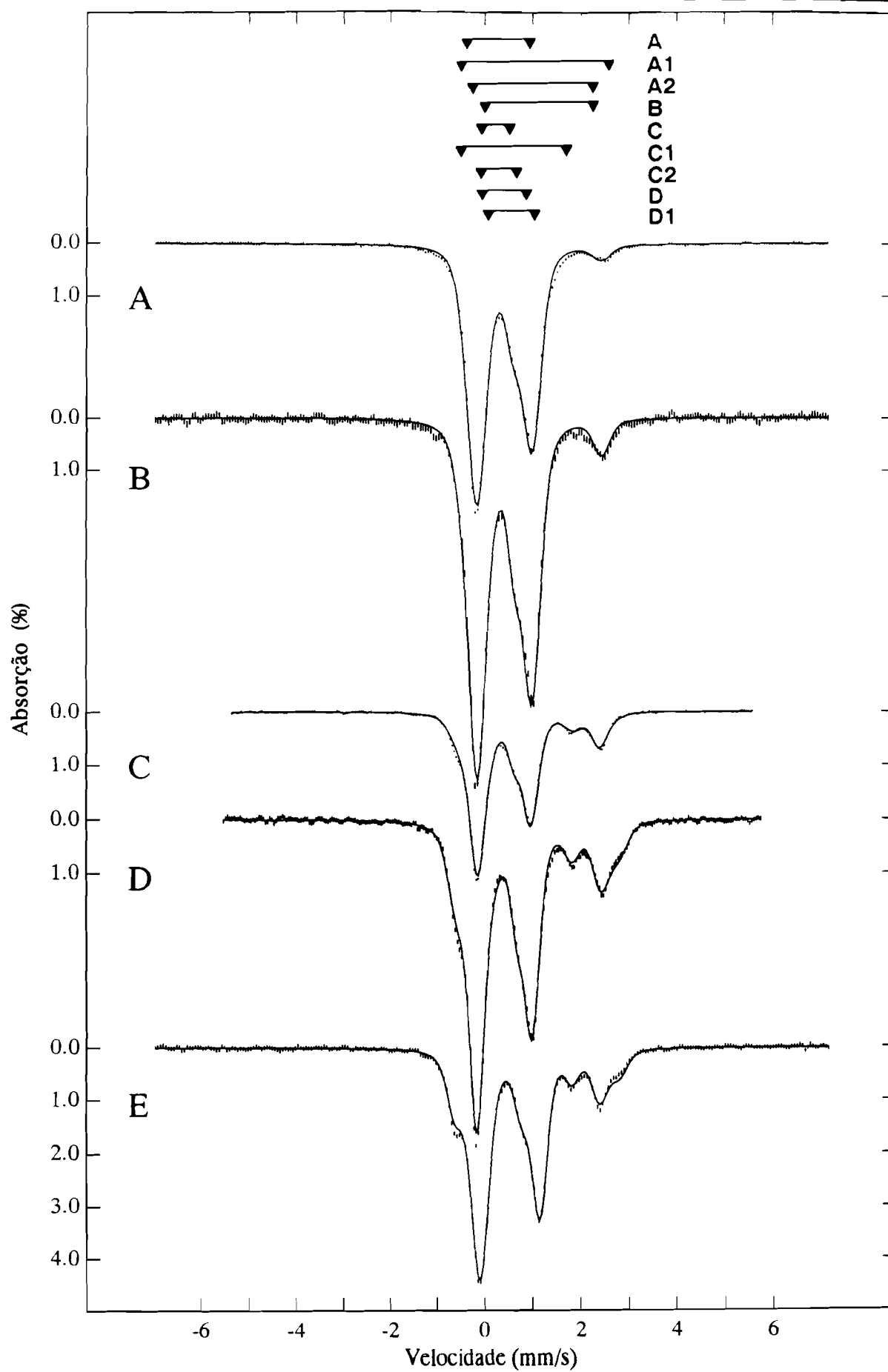
Por uma questão de simplicidade, os agregado que dão origem às componentes magnética e diamagnética serão denominados, respectivamente, de agregado I e agregado II.

De modo a proceder ao estudo dos diferentes estados de oxidação dos agregados, foram preparadas amostras a diferentes potenciais de oxidação-redução. Assim, para obter amostras num estado de oxidação inferior ao da amostra nativa, procedeu-se à redução com ditionito de sódio ou com viologénio de metilo reduzido com hidrogenase/hidrogénio. Contrariamente, amostras a potenciais superiores aos da amostra nativa foram obtidas por adição de ferricianeto de potássio. De seguida discutem-se os dados obtidos, na ausência de campo magnético aplicado e a temperatura alta, para quatro amostras diferentes (uma mais oxidada e três mais reduzidas que a amostra nativa). Os espectros obtidos, bem como os ajustes feitos, encontram-se representados na figura VII.16. Os parâmetros obtidos dos ajustes são apresentados na tabela VII.7.

Os dados obtidos estão de acordo com o modelo da figura VII.17. Este modelo descreve 6 diferentes estados de oxidação para a proteína. Assim, na proteína nativa (tal como foi isolada) o agregado I está no estado 5+ (um ferro ferroso e cinco ferros férricos), postulando-se que o agregado II se encontra no estado 4+. O agregado I pode ainda perder um electrão, passando ao estado de oxidação 6+ (onde todos os ferros se encontram no estado férrico) e dando origem a um novo estado de oxidação da proteína. Este mesmo agregado possui ainda a possibilidade de aceitar 3 electrões dando origem aos estados de oxidação 4+, 3+ e 2+. Finalmente o agregado II pode aceitar um electrão, dando origem ao estado de oxidação 3+. Para simplificação os estados de oxidação da proteína serão referidos como $[n+,m+]$, sendo $n+$ e $m+$, respectivamente, o estado de oxidação do agregado I e II.

Apesar de, quer o espectro da amostra I, quer o espectro da amostra nativa não possuírem resolução suficiente para que faça sentido uma análise com um número de doubletos maior do que o que atrás foi utilizado, por uma questão de coerência com a análise dos espectros mais reduzidos foi efectuado um novo ajuste da amostra nativa no qual se utilizaram quatro doubletos de quadrupolo. O resultado obtido através desta análise (ver tabelas VII.7 e VII.8) é equivalente ao anteriormente obtido.

Figura VII.16 - Espectros de Mössbauer de diversos estados de oxidação da nova proteína de ferro-enxofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Os espectros foram adquiridos na ausência de campo magnético aplicado e a 140 K (B) ou 150 K (A, C, D e E). As linhas sobrepostas aos espectros experimentais são resultantes dos ajustes efectuados com os parâmetros das tabelas VII.7 e VII.8. Os espectros A, B, C, D e E correspondem, respectivamente, às amostras 1, nativa, 2, 3 e 4. No topo da figura estão representados graficamente os diferentes doubletos de quadrupolo usados.



A amostra 1 foi oxidada com ferricianeto de potássio (+318 mV vs NHE). O espectro obtido a 140 K (ver figura VII.16a) é semelhante ao obtido para a amostra nativa diferindo apenas na percentagem de absorção do pico situado a 2.4 mm/s. Por ajuste do espectro verifica-se que o dobleto de quadrupolo correspondente possui aproximadamente 5.5% da absorvância total (em vez dos cerca de 8% presentes na nativa). Tal facto, e tomando o valor de 5.5% para o ferro ferroso, leva a pensar que nesta amostra aproximadamente 66% da proteína encontra-se no estado $[5+,4+]$, com a percentagem restante no estado $[6+,4+]$.

Por redução com metilo de viologénio obteve-se a amostra 2, a um potencial igual a -69 mV. O espectro, obtido a 150 K, revela agora a presença de um pico situado a +1.8 mm/s e vários picos entre +2.2 e 3.0 mm/s (ver figura VII.16c). Após ajuste do espectro, foi possível identificar estes picos como pertencentes a quatro diferentes dobletos de quadrupolo com parâmetros típicos de ferro ferroso de spin alto. Uma observação importante é que o dobleto de quadrupolo central, que foi associado ao agregado II na análise da amostra nativa, permanece constante neste espectro. Assim pensa-se que não existiu qualquer modificação do estado de oxidação do agregado II e que todos os ferros ferrosos pertencem ao agregado I. Relativamente à nativa, aparecem agora mais três dobletos de quadrupolo atribuídos a ferros ferrosos, dois dos quais contribuindo com cerca de 8.3% e um deles contribuindo apenas com 2.3%. Este facto faz pensar que aproximadamente 72% da proteína em solução se encontra no estado $[3+,4+]$, estando os restantes 28% no estado $[2+,4+]$.

Por redução com ditionito de sódio obteve-se a amostra 3, a um potencial igual a -110 mV. O espectro adquirido a 150 K é muito semelhante ao da amostra 2 (ver figura VII.16d). No entanto o dobleto de quadrupolo, que na amostra 2 contribuía em 2.3%, encontra-se agora mais individualizado e contribuindo em cerca de 8.3%. Na sequência da interpretação feita para a amostra 2, pode-se pensar que, a -110 mV, o agregado I foi reduzido por 3 electrões e a proteína em solução encontra-se totalmente no estado $[2+,4+]$.

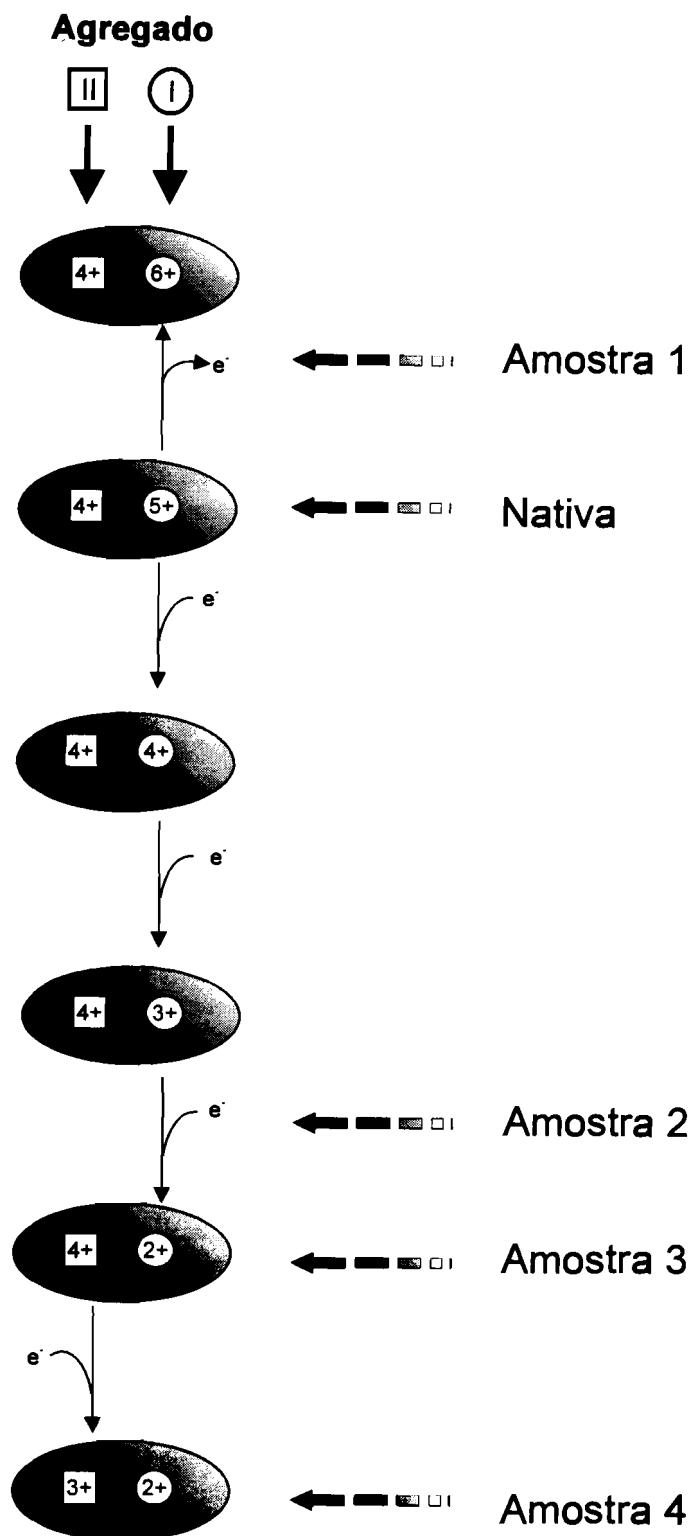


Figura VII.17 - Modelo proposto para os diferentes estados de oxidação da nova proteína de ferro-enxofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

Finalmente, por redução com excesso de ditionito de sódio obtém-se o estado completamente reduzido da proteína. O ajuste do espectro obtido a 150 K (ver figura VII.16e) revela uma modificação substancial, pois o dobleto de quadrupolo central atribuído ao agregado II apresenta agora um desvio isomérico maior que o observado em todas as outras amostras. Uma interpretação possível é que o agregado II foi reduzido e que a proteína se encontra no estado $[+2,+3]$. O facto de não se observar um dobleto de quadrupolo individualizado (como se observa para o agregado I), pode ser explicado através da deslocalização do electrão pelos ferros constituintes do agregado, de forma semelhante ao que acontece noutros tipos de agregados de ferro-enzofre conhecidos (ver capítulo II).

Da análise das diversas amostras, podemos extrair dois factos que apoiam a existência de dois agregados. Uma observação importante é que, durante os diversos estados de oxidação, a componente atribuída ao agregado II permanece constante. Apenas no estado totalmente reduzido essa componente tem parâmetros diferentes, mas contribuindo sempre com 50% da absorção total do espectro. A segunda observação diz respeito à percentagem de absorção obtida para cada um dos ferros ferrosos (dobletos de quadrupolo A1, A2, B e C1) nunca ser superior a 1/12 da absorção total do espectro, tal como seria de esperar se cada dobleto correspondesse a um único sítio de um dos agregados de seis ferros.

Na figura VII.18 apresenta-se os espectros obtidos a 4.2 K e na presença de um campo magnético aplicado de 0.5 kG. A análise destes espectros é significativamente mais difícil, pois existem alguns estados de oxidação que nestas condições apresentam um espectro magnético. No entanto, podemos extrair alguma informação da sequência de espectros da figura VII.18. O facto mais saliente é o de, para a amostra totalmente reduzida, estarmos na presença de um espectro que contém uma grande componente magnética e no qual deixou de estar presente o dobleto de quadrupolo anteriormente associado ao agregado II (em contraste com os espectros das amostras mais oxidadas). Este facto está de acordo com o modelo apresentado, que prevê a passagem do agregado II do estado de oxidação 4+ (diamagnético) para o estado 3+ (paramagnético).

Tabela VII.7

Parâmetros obtidos dos ajustes dos espectros de Mössbauer adquiridos a alta temperatura.

Agregado	Doblete de Quadrupolo	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)
I	A	1.54 ± 0.10	0.32 ± 0.01
	A1	3.31 ± 0.15	1.07 ± 0.02
	A2	2.73 ± 0.07	1.03 ± 0.03
	B	2.28 ± 0.05	1.25 ± 0.05
	C	0.79 ± 0.05	0.25 ± 0.01
	C1	2.44 ± 0.01	0.60 ± 0.02
	C2	0.96 ± 0.01	0.29 ± 0.01
II	D	1.12 ± 0.02	0.41 ± 0.01
	D1	1.22 ± 0.01	0.54 ± 0.01

Tabela VII.8

Percentagens usadas para ajustar os espectros de Mössbauer obtidos a altas temperaturas.

	χ^2	Agregado I	Agregado II				
Amostra 1	6.56	D (50%)	A (19%)	B (5.5%)	C (24.9%)		
Nativa	1.79	D (50%)	A (16.6%)	B (8.3%)	C (24.4%)		
Amostra 2	2.71	D (50%)	A (6%) A1 (2.3%)	A2 (8.3%)	B (8.3%)	C (16.6%)	C1 (8.0%)
Amostra 3	2.34	D (50%)	A1 (8.3%)	A2 (8.3%)	B (8.3%)	C (16.6%)	C1 (8.0%)
Amostra 4	0.97	D1 (50%)	A1 (8.3%)	A2 (8.3%)	B (8.3%)	C2 (16.6%)	C1 (8.3%)

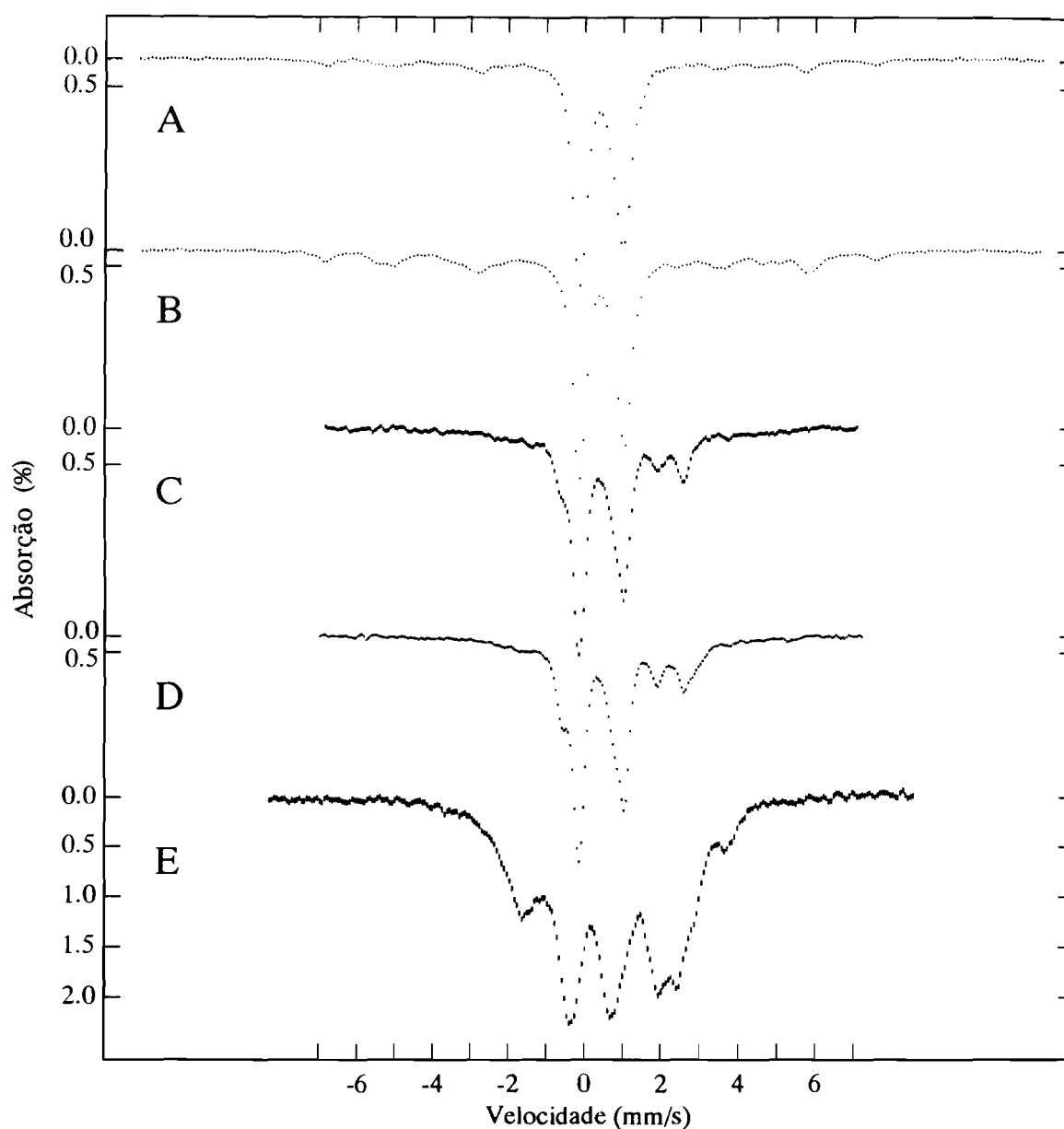


Figura VII.18 - Espectros de Mössbauer de diversos estados de oxidação da nova proteína de ferro-enxofre isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Os espectros foram adquiridos a 4.2 K na presença de um campo magnético aplicado, paralelamente a radiação γ , de 0.5 kG. Os espectros A, B, C, D e E correspondem, respectivamente, às amostras 1, nativa, 2, 3 e 4

VII.9. *Discussão.*

Neste capítulo apresentaram-se os resultados do isolamento e caracterização de uma proteína a partir do extrato celular de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Apesar do seu papel no metabolismo desta espécie de bactéria redutora de sulfato/nitrato ser desconhecido, esta proteína evidencia-se pela presença de agregados extraordinariamente invulgares. Como foi discutido no capítulo II, apenas foi possível identificar agregados de ferro-enxofre com mais de 4 átomos de ferro na sua constituição na proteína dependente de molibdénio da nitrogenase.

Os dados espectroscópicos apresentados, para esta proteína, levam à previsão da existência de novos centros de ferro-enxofre com seis átomos de ferro. A espectroscopia de Mössbauer foi particularmente importante para chegarmos a esta conclusão. Assim, podemos resumir do modo seguinte as diversas evidências que suportam a presença dos agregados com seis ferros:

- i) Foi possível desconvoluir em seis componentes diferentes (cada uma contribuindo com aproximadamente 8% para o total da absorção) o espectro uniaxial que representa metade da absorção total do espectro da amostra nativa (4.2 K).
- ii) Os parâmetros usados na desconvolução estão de acordo com o observado para o espectro obtido a temperaturas elevadas (140 K). Nestas condições, aproximadamente 1/12 da absorção total do espectro pode ser atribuída a um ião ferroso de spin alto. De acordo com a análise feita, este átomo de ferro representará um sítio de um agregado de seis ferros (denominado agregado I).
- iii) A análise dos espectros obtidos, a alta temperatura, para amostras em diferentes estados de oxidação mostra que é possível reduzir mais três sítios do agregado I, com cada sítio novo a contribuir com aproximadamente 8% para o total da absorção do espectro. Assim, no estado mais reduzido deste agregado quatro dos ferros estão no estado ferroso e dois no estado férrico. De acordo com os dados obtidos para a amostra nativa, três dos sítios ferrosos aparentam ter oxigénios e/ou azotos como ligandos.
- iv) Em todos os estados de oxidação aproximadamente 50% da absorção dos espectros pode ser atribuída a um dobleto de quadrupolo diamagnético, correspondente a um segundo

agregado (agregado II). Apenas no estado totalmente reduzido esta componente deixa de existir, dando origem a uma componente magnética de igual intensidade. A análise dos espectros a temperaturas elevadas sugere que após a redução, os ferros constituintes do agregado II partilham os electrões de modo semelhante ao verificado nos agregados de [3Fe-4S] ou [4Fe-4S], ou seja, parece existir uma deslocalização electrónica por todo o agregado.

Outros dados que apontam para a existência de um agregado de seis ferros provém da espectroscopia de RPE. O espectro de RPE da proteína totalmente reduzida possui um sinal semelhante ao observado para o agregado sintético descrito por Kanatzidis e colaboradores.⁷ Este agregado possui seis ferros numa estrutura prismática (ver tabela VII.1). A presença deste sinal pode ser utilizado como mais uma evidência que suporta a existência de pelo menos um agregado com uma estrutura prismática. Com efeito, a obtenção de um resultado idêntico ao descrito foi interpretado por Hagen e colaboradores², como prova da existência de um agregado com seis ferros na proteína homóloga à descrita neste capítulo e isolada de *D. vulgaris*.

No estado nativo, o espectro de RPE apresenta um conjunto de ressonâncias atribuídas a um sistema de spin igual a 9/2. Sistemas semelhantes têm sido descritos para outras proteínas, tais como a desidrogenase do CO ou a redutase do sulfito.²⁶ Com base na analogia com a proteína descrita neste capítulo, foi levantada a hipótese de estas proteínas conterem agregados de seis ferros. Alguns reparos devem ser feitos a estas conclusões. nenhuns outros dados suportam estas conclusões (nomeadamente dados provenientes da espectroscopia de Mössbauer e da cristalografia de raios-X). Outra observação pertinente é que apesar da presença de um estado de spin com $S = 9/2$, nenhuma confirmação de que este estado é biologicamente relevante foi efectuada (i.e. não foi inequivocamente provado que o estado com $S = 9/2$ existe em porções maioritárias nas amostras estudadas). A utilização deste estado de spin como indicação para a existência de agregados com uma estequiometria elevada revela-se também perigosa devido ao facto de eles existirem noutros sistemas. Assim, tal como foi descrito no capítulo II, o estado de spin com $S = 9/2$ pode ser atribuído a pares férricos-ferrosos em alguns estados de oxidação dos agregados [3Fe-4S] e

[4Fe-4S]. Também em alguns compostos binucleares de ferro foi possível provar a existência destes estados de spin.

Como nota final desta discussão é importante afirmar que o modelo aqui apresentado para a explicação dos resultados é, sem dúvida, um modelo preliminar. Aparentemente simples, este sistema possui um elevado grau de complexidade. Não seria portanto de prevêr que um modelo baseado em, ainda poucos, dados espectroscópicos pudesse explicar este sistema na sua totalidade. Por exemplo, o modelo admite que no estado de oxidação [4+,3+] o agregado I está num estado paramagnético. No entanto, não foi possível observar o sinal de RPE deste estado. Uma possível explicação é a de estarmos, por exemplo, na presença de um estado de spin $9/2$ com um valor de D simultaneamente positivo e suficientemente elevado para apenas o estado fundamental estar populado. Nestas condições seria extremamente difícil a observação de um sinal de RPE uma vez que se prevê uma grande anisotropia para os valores de g ($g_x = g_y = 0$ e $g_z = 18$, sistemas axiais).

Um modelo mais completo só poderá ser obtido após a caracterização espectroscópica de cada um dos estados de oxidação da proteína. Com efeito, a caracterização descrita neste capítulo deve ser considerada como uma caracterização preliminar que, esperamos, permitirá no futuro chegar à compreensão global de tão interessante sistema.

VII.10. Bibliografia.

1. Moura, I., Tavares, P., Moura, J.J.G., Ravi, N., Huynh, B.H., Liu, M.-Y., e LeGall, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4489-4496.
2. Hagen, W.R., Pierik, A.J., e Veeger, C. (1989) *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **85**, 4083-4090.
3. Pierik, A.J., Wolbert, R.B.G., Mutsaers, P.H.A., Hagen, W.R., e Veeger, C. (1992) *Eur. J. Biochem* **206**, 697-704.
4. Stokkermans, J.P.W.G., Pierik, A.J., Wolbert, R.B.G., Hagen, W.R., Van Dongen W.M.A.M., e Veeger, C. (1992) *Eur. J. Biochem.* **208**, 435-442.
5. Stokkermans, J.P.W.G., Van den Berg, W.A.M., Van Dongen, W.M.A.M., e Veeger, C. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1132**, 83-87.
6. Stokkermans, J.P.W.G., Houba, P.H.J., Pierik, A.J., Hagen, W.R., Van Dongen, W.M.A.M., e Veeger, C. (1992) *Eur. J. Biochem.* **210**, 983-988.
7. Kanatzidis, M.G., Hagen, W.R., Dunham, W.R., Lester, R.K., e Coucouvanis, D. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 953-961.
8. Kanatzidis, M.G., Salifoglou, A., e Coucouvanis, D. (1986) *Inorg. Chem.* **25**, 2460-2468.
9. Saak, W., Henkel, G., e Pohl, S. (1984) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **23**, 150-151
10. Snyder, B.S., Reynolds, M.S., Noda, I., e Holm, R.H. (1988) *Inorg. Chem.* **27**, 595-597.
11. Snyder, B.S., e Holm, R.H. (1988) *Inorg. Chem.* **27**, 2339-2347.
12. Reynolds, M.S., e Holm, R.H. (1988) *Inorg. Chem.* **27**, 4494-4499.
13. Hagen, K.S., Watson, A.D., e Holm, R.H. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3905-3913.
14. Christou, G., Sabat, M., Ibers, J.A., e Holm, R.H. (1982) *Inorg. Chem.* **21**, 3518.
15. Strasdeit, H., Krebs, B., e Henkel, G. (1984) *Inorg. Chem.* **23**, 1816-1825.
16. Agresti, A., Bacci, M., Cecconi, F., Ghilardi, C.A., e Midollini, S. (1985) *Inorg. Chem.* **24**, 689-695.

17. Cecconi, F., Ghilardi, C.A., Midollini, S., Orlandini, A., e Zanello, P. (1987) *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 831.
18. Noda, I., Snyder, B.S., e Holm, R.H. (1986) *Inorg. Chem.* 25, 3851-3853.
19. Pohl, S., e Saak, W. (1984) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23, 907-908.
20. Fischer, D.S., e Price, D.C. (1964) *Clin. Chem.* 10, 21-31.
21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
22. Fogo, J.K., e Popowski, M. (1949) *Anal. Chem.* 21, 732-734.
23. Moore, S., e Stein, W.H. (1963) *Methods Enzymol.* 46, 41-45.
24. Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A.V., Moura, J.J.G., LeGall, J., DerVartanian, D.V., Peck, H.D., Jr., e Huynh, B.H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 16435-16450.
25. van der Zwaan, J.W., Albracht, S.P.J., Fontijn, R.D., e Mul, P. (1987) *Eur. J. Biochem.* 169, 377-384.
26. Pierik, A.J., e Hagen, W.R. (1991) *Eur. J. Biochem.* 195, 505-516.

Apêndice A.

MÉTODOS

Apêndice A. Métodos	255
1. Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.	257
2. Determinação de proteína - Método de Lowry.	260
3. Determinação do conteúdo em ferro - Método do TPTZ.	261
4. Meio de crescimento e preparação do extrato celular.	263
5. Hidrólise ácida.	265
6. Oxidação perfórmica.	268
7. Preparação de soluções tampão.	268
7.1. Tampão fosfato.	268
7.2. Tampão Tris-HCl.	269
8. Titulações potenciométricas.	270
9. Determinação das constantes de calibração dos espectros de Mössbauer.	276
10. Espectrofotômetro de UV-visível.	276
11. Espectrômetro de RPE.	276
12. Bibliografia.	278

A.1. Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

Esta técnica foi usada para determinação de massas moleculares, bem como para avaliar a pureza das diversas fracções proteicas. O método consiste numa adaptação da técnica introduzida por Lamelli e colaboradores.¹ Na tabela A.2 estão descritas as diversas soluções "stock" necessárias à execução de cada gel. Nas tabelas A.1a e A.1b estão indicados os volumes a usar em função da percentagem de poliacrilamida que se pretende usar.

Foram utilizados dois tipos de tinas para electroforese: *i*) Pharmacia/LKB ("LKB 2001 Vertical Electrophoresis" ou *ii*) BioRad ("Mini-Protean II Dual Slab Cell"). A escolha de cada uma das tinas dependeu da quantidade de proteína a utilizar e/ou da resolução pretendida. Todos os volumes e quantidades referidas na preparação das amostras e na tabela A.2 são referentes à primeira destas tinas, entre parêntesis são dados os valores referentes à segunda tina.

Para géis de poliacrilamida a 20% deve-se proceder às seguintes modificações: *i*) utilizar uma solução com 0.15 g de Bisacrilamida, e não 0.8 g, na preparação do gel resolvente (tabela A.2a); *ii*) utilizar uma solução de persulfato de amónio a 10%.

A preparação das amostras deve ser feita do seguinte modo: as amostras de proteínas, 25 µl contendo aproximadamente 20 µg (10 µl, 3.5 µg), foram misturadas com igual volume de tampão (solução VII). As amostras foram então mantidas a 100° C durante 2 minutos.

Foram utilizados padrões de calibração para electroforese (Pharmacia) contendo as seguintes proteínas:

- Conjunto de baixo peso molecular: fosforilase b (94 kDa), albumina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbónica (30 kDa), inibidor da tripsina (20.1 kDa) e α -lactalbumina (14.4 kDa).
- Conjunto de alto peso molecular: tiroglobulina (330 kDa), albumina (67 kDa), catalase (60 kDa), desidrogenase do lactato (36 kDa) e ferritina (18.5 kDa).

Tabela A.1a

Volumes necessários de cada solução "stock" em função da percentagem de acrilamida do gel separador ("Running gel").

Solução	% Acrilamida (volumes em ml)				
	7.5%	10%	12.5%	15%	20%
I	7.5 (1.25)	7.5 (1.25)	7.5 (1.25)	7.5 (1.25)	8.0
III	7.5 (1.25)	10 (1.67)	12.6 (2.1)	15 (2.5)	21.3
H ₂ O	7.5 (1.25)	8 (1.33)	5 (0.825)	3 (0.5)	2.7

Após a adição dos volumes, a solução resultante deve ser desarejada sob vácuo. Para iniciar a polimerização adicionou-se 4.5 (0.75) ml de solução V e 15 (2.5) µl de TEMED.

Tabela A.1b

Volumes necessários de cada solução "stock" em função da percentagem de acrilamida do gel concentrador ("Sacking gel").

Solução	Volume (ml)
II	2.5 (0.5)
III	1.5 (0.3)
H ₂ O	3.0 (0.6)

Após a adição dos volumes, a solução resultante deve ser desarejada sob vácuo. Para iniciar a polimerização adicionou-se 2 (0.4) ml de solução V e 10 (2.0) µl de TEMED.

Tabela A.2

Soluções "stock" para geis de poliacrilamida na presença de 1% de SDS

Solução	Reagentes	Quantidade	Observação
I Solução para gel separador	Tris Base (1.5 M)	17.18 g	pH=8.8-9.0 Guardar a 4 °C
	HCl	até pH 8.8	
	SDS a 10% (Solução IV)	4 ml	
	H ₂ O	até 100 ml	
II Solução para gel concentrador	Tris Base (0.5 M)	6.06 g	pH=6.6-6.8 Guardar a 4 °C
	HCl	até pH 6.8	
	SDS a 10% (Solução IV)	4 ml	
	H ₂ O	até 100 ml	
III Acrilamida (30%) / Bisacrilamida	Acrilamida	30 g	Guardar a 4 °C
	Bisacrilamida	0.8 g	
	H ₂ O	até 100 ml	
IV SDS 10%	SDS	10 g	—
	H ₂ O	até 100 ml	
V Persulfato de amônio	Persulfato de amônio	10 mg	Preparar antes de usar
	H ₂ O	até 10 ml	
VI Tampão Tris-Glicina	Glicina (1.92 M)	144.1 g	Diluir 1:10 antes de usar
	Tris Base (0.25 M)	30.3 g	
	SDS	10 g	
VII Tampão para as amostras	Glicerol	2 ml	O β-Mercaptoetanol pode ser substituído por ditiotreitol ou por H ₂ O no caso de não se querer utilizar nenhum destes agentes.
	β-Mercaptoetanol	1 ml	
	SDS a 10 % (Solução IV)	5 ml	
	Solução II	2.5 ml	
	azul de bromofenol	2 mg	
VIII Solução corante	Comassie Blue R-250	1g	—
	Ácido acético	15 ml	
	Metanol	90 ml	
	H ₂ O	até 200 ml	
IX Solução descorante	Ácido acético	75 ml	—
	Metanol	450 ml	
	H ₂ O	até 1000 ml	

A.2. Determinação de proteína - Método de Lowry.

A determinação de proteína foi efectuada segundo o método de Lowry e colaboradores.² Na tabela A.3 estão discriminadas as soluções "stock" necessárias à execução do método.

Adicionou-se às amostras de proteínas (5 a 60 µg em 0.1 ml) 1 ml de reagente C. Deixou-se incubar, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. De seguida adicionou-se 0.1 ml de reagente D e misturou-se imediatamente. Deixou-se incubar, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Ao fim desse tempo a absorvância foi lida a 580, 680 e 750 nm.

Usou-se como padrão uma mistura de albumina e globulina ("*Sigma Diagnostics Protein Standard*", 5.0 g/dl albumina + 3.0 g/dl globulina).

Tabela A.3

Soluções "stock" para a determinação de proteína.

Solução	Reagentes	Observações	Preparação
A	2% Na ₂ CO ₃ em 0.1 N NaOH	—	2 g Na ₂ CO ₃ + 0.4 g NaOH em 100 ml H ₂ O
B1	1% CuSO ₄ .5H ₂ O	—	1 g CuSO ₄ .5H ₂ O em 100 ml H ₂ O
B2	2% Tartarato de sódio	—	2 g Tartarato de sódio em 100 ml H ₂ O
B	Mistura 1:1 das soluções B1 e B2	Preparar de fresco	—
C	Solução alcalina de Cobre.	Preparar de fresco	Mistura 50:1 das soluções A e B
D	Diluição 1:1 do reagente de Folin	Preparar de fresco	—

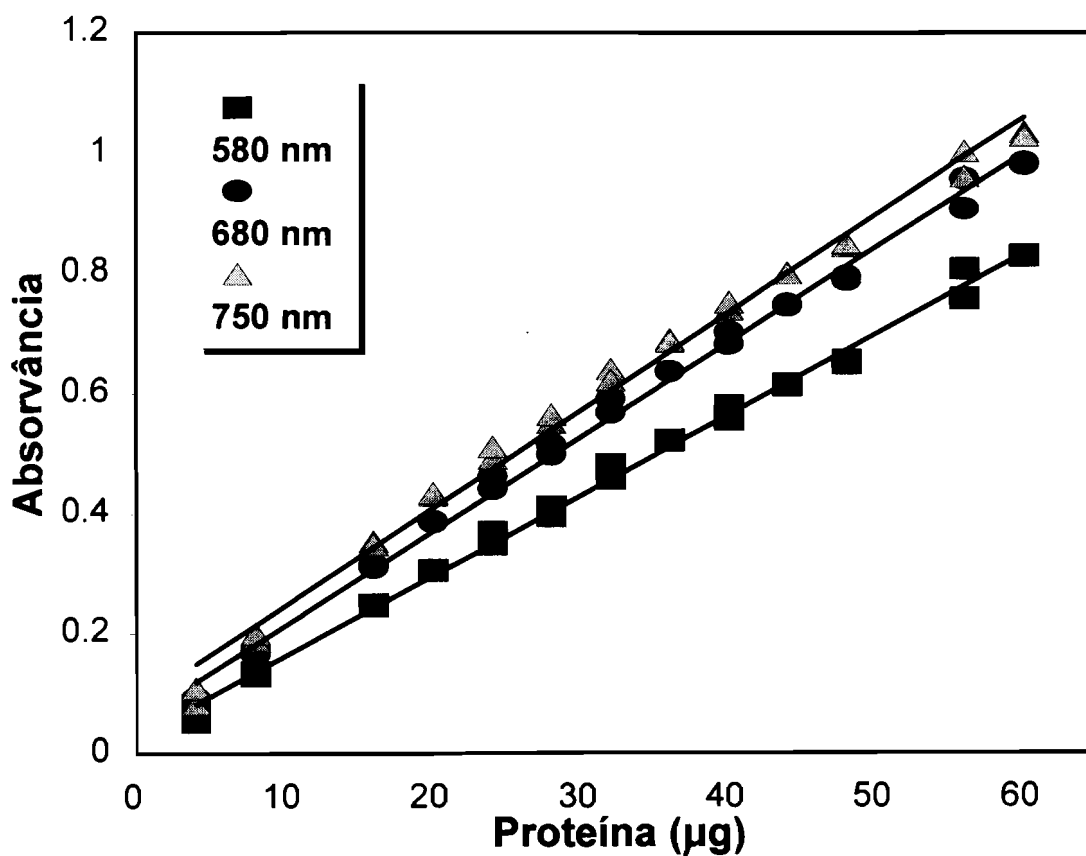


Figura A.1 - Recta de calibração obtida para a determinação de proteína efectuada pelo método atrás descrito.

A.3. Determinação do conteúdo em ferro - Método do TPTZ.

Um dos métodos usados para a determinação do conteúdo em ferro em amostras proteicas foi uma adaptação do método do TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina).³ As soluções necessárias à execução deste método encontram-se listadas na tabela A.3. O método é baseado na reacção do TPTZ com ferro no estado ferroso. A determinação da quantidade total de ferro presente na amostra de proteína é feita em três passos: i) extracção do ferro da proteína por incubação com ácido clorídrico e precipitação da parte proteica com ácido

tricloroacético; ii) após centrifugação, o pH do sobrenadante é acertado a 4.3 com acetato de amônio e redução do ferro é efectuada por adição de cloreto de hidroxilamina; iii) adição de TPTZ com a concomitante formação do complexo corado.

As amostras de proteína (5 a 20 nmol de ferro) com um volume de 400 µl foram inicialmente reduzidas com 40 µl de ácido ascórbico. De seguida foram adicionados 50 µl de HCl, misturando-se num vortex. Após uma espera de 10 minutos adicionaram-se 50 µl de TCA. Procedeu-se então a uma centrifugação (5 minutos a 8000 rpm, Microfuge 12 - Beckman) e transferiu-se 400 µl de solução para um novo tubo. Adicionaram-se 100 µl de acetato de amônio e 40 µl de $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$ e agitou-se num vortex. Finalmente, foram adicionados 40 µl de TPTZ e agitou-se num vortex. Após se esperar 10 minutos mediu-se a absorvância a 593 nm.

Tabela A.4

Reagentes necessários para a determinação de ferro pelo método do TPTZ.

Solução	Concentração	Preparação
Ácido ascórbico	10%	10 g em 100 ml H_2O
HCl	8 N	66.2 ml HCl concentrado (37%) e 33.8 ml H_2O
Ácido tricloroacético	80%	40 g em 50 ml H_2O
Acetato de amônio	75%	75 g em 100 ml H_2O
$\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$	10%	10 g em 100 ml H_2O
TPTZ	0.004 M	62.5 mg + 1 ml de HCl 2 N em 50 ml H_2O

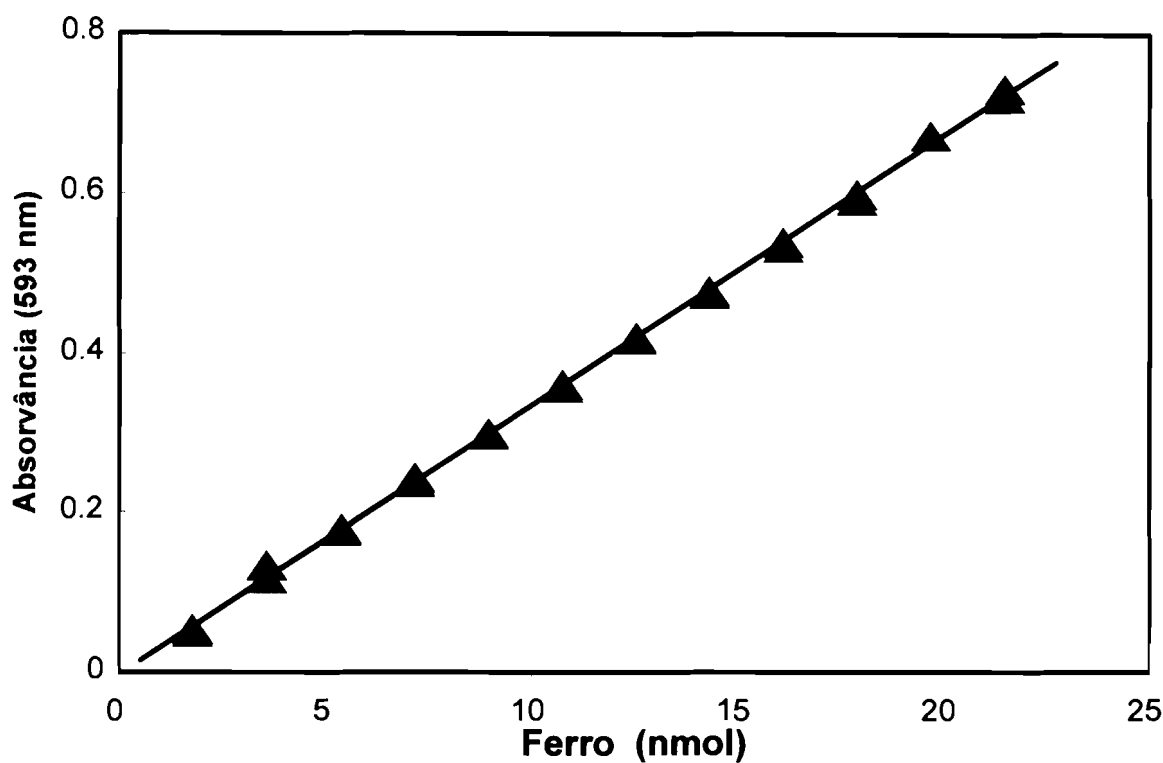


Figura A.2 - Recta de calibração obtida para a determinação de ferro efectuada pelo método atrás descrito.

A.4. Meio de crescimento e preparação do extrato celular.

O meio de crescimento usado para a obtenção da massa celular de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 foi o descrito da tabela A.4. As quantidades são referidas para um volume total de 400 l. O pH do meio é acertado a 7.5 antes de ser autoclavado. Nos meios de crescimento com ^{57}Fe , foi omitido o extrato de levedura e o $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Na solução de oligoelementos as quantidades são referidas ao volume total de 4 l. O pH da

solução deve ser acertado entre 6.5 e 7.0 com hidróxido de potássio (são necessários aproximadamente 20 g por cada 4 l de solução).

O meio descrito na tabela A.4 é uma adaptação do meio descrito por Liu and Peck⁴. Em relação a este meio foi efectuada uma modificação no que diz respeito ao aceitador final de electrões. No caso de bactérias redutoras de sulfato é usual que para tal efeito seja utilizado sulfato, mas devido ao facto de esta estirpe bacteriana também poder usar nitrato (como referido no capítulo I) este foi o aceitador final de electrões preferido. As razões desta escolha foram as seguintes: *i*) ser possível obter um maior rendimento quando se usa nitrato como aceitador final de electrões; *ii*) promover a produção da redutase do nitrito; *iii*) impedir a precipitação do sulfureto de ferro. Assim, em todos os crescimentos efectuados foi utilizado nitrato, em vez de sulfato, como aceitador final de electrões.

A utilização da espectroscopia de Mössbauer obrigou também à modificação do meio de crescimento, pois o isótopo de ferro mais abundante (⁵⁶Fe) não é activo para esta espectroscopia (não possui momento nuclear). Neste caso, a abundância natural do isótopo em que estamos interessados, ⁵⁷Fe, é menor que 2%. Assim, de modo a possibilitar os estudos da espectroscopia de Mössbauer foram usados meios de cultura contendo ⁵⁷Fe. Usaram-se, por cada crescimento, 200 mg de ⁵⁷Fe (95% de enriquecimento) que foram dissolvidos sucessivamente em H₂SO₄ e HCl, neutralizados e posteriormente adicionados a 400 litros de meio.

Após a obtenção da massa celular (cerca de 800 g por 400 litros de meio, nas condições descritas) as células foram resuspendidas em tampão Tris-HCl 10 mM (pH = 7.6). Para efectuar a ruptura da parede e da membrana celular utilizou-se uma "French Press", aplicando uma pressão máxima de 9000 p.s.i. O extrato assim preparado foi incubado com DNase I e DNase II de modo a degradar o DNA e o RNA presentes, e seguidamente centrifugado a 19000 x g durante 30 minutos e posteriormente ultracentrifugado a 180000 x g durante 75 minutos. Após estas operações o extrato encontra-se pronto para que seja iniciada a purificação.

Tabela A.5

*Composição do meio de crescimento usado para
Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774.*

Meio de Crescimento		Solução de Oligoelementos	
Reagente	Quantidade	Reagente	Quantidade
Lactato de sódio	4 l	Ácido nitritotriacético	51.2 g
NH ₄ Cl	760 g	FeCl ₂ .4H ₂ O	0.84 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	627 g	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.4 g
Extrato de levedura	380 g	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.68 g
K ₂ HPO ₂	190 g	ZnCl ₂	0.4 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	76 g	CuCl ₂ .H ₂ O	0.08 g
FeCl ₂ .4H ₂ O	2.75 g	H ₃ BO ₃	0.04 g
Solução de Oligoelementos	4 l	Na ₂ SeO ₃	0.068 g
NaNO ₃	912 g	Na ₂ MoO ₄	0.04 g
Cloreto de cisteína	80 g	NiCl ₂ .6H ₂ O	0.112 g

A.5. Hidrólise ácida.

A hidrólise é efectuada segundo o método de Moore e Stein⁵. A amostra a ser hidrolizada (10 nmol) é colocada num tubo de hidrólise (balões de colo alto) e seca sob uma corrente de azoto. De seguida adicionam-se 200 µl de HCl 6N (com fenol à concentração de 1 mg/ml). A amostra é então desgasificada e selada do seguinte modo. Com o auxílio de um maçarico (oxigénio/propano) faz-se uma constrição no colo do tubo e congela-se a amostra em azoto líquido. O tubo é então colocado sob vácuo e a amostra descongelada. Este ciclo (congelamento/descongelamento, sob vácuo) é repetido duas a

três vezes, ou até não se formarem bolhas de ar a quando da descongelação. Finalmente, o tubo é selado sob vácuo (utilizando novamente o maçarico) e colocado numa estufa a 106 °C.

Cada amostra é preparada em triplicado, pois é necessário proceder a diferentes tempos de hidrólise para avaliar a evolução da concentração dos diferentes ácidos aminados ao longo do tempo. Existem ácidos aminados que são especialmente lábeis em meio ácido o que faz com que a sua concentração diminua com o tempo de hidrólise. Por outro lado algumas ligações peptídicas são mais dificilmente hidrolisadas o que implica que a concentração dos ácidos aminados que as constituem aumente com o tempo de hidrólise. Assim, fazendo a hidrólise por diferentes tempos é possível estimar a concentração inicial dos vários ácidos aminados presentes na amostra.

Após o tempo requerido (normalmente 22, 44 e 66 horas), os tubos são retirados da estufa e abertos. As amostras são então liofilizadas, diluídas em 1 ml de tampão Na-S (Beckman) e filtradas (Millipore, 0.22 µm). Ficam assim prontas a ser injectadas no analisador automático ("Beckman high performance analyser system 6300E").

Como resultado final é obtido um cromatograma semelhante ao da figura A.3. Procede-se então à integração dos picos cromatográficos atribuídos a cada um dos ácidos aminados. Por comparação das áreas obtidas com áreas padrão (obtidas a partir da injeção de concentrações conhecidas dos diversos ácidos aminados) obtém-se a quantidade existente na amostra de cada ácido aminado.

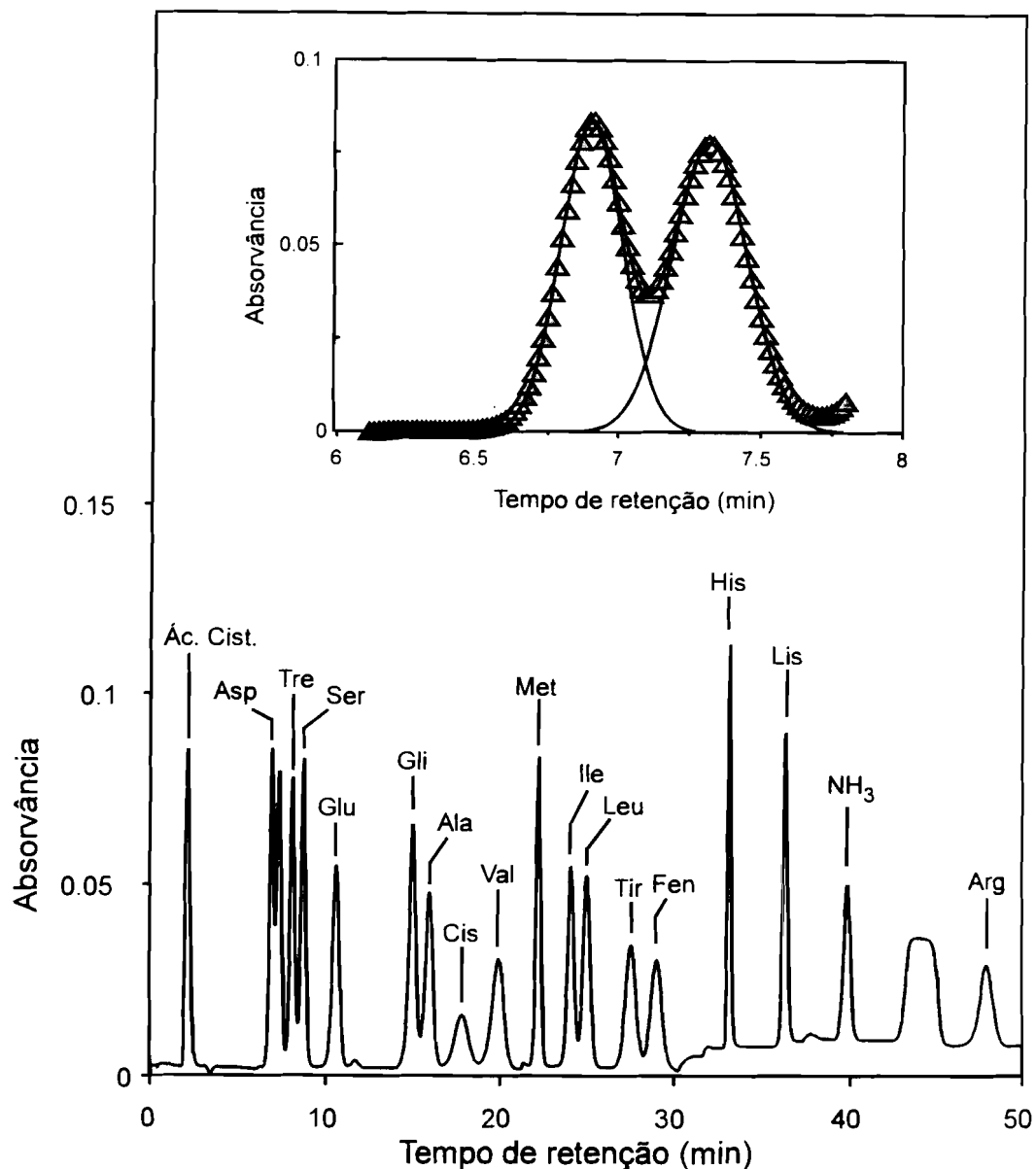


Figura A.3 - Cromatograma tipo resultante da análise de ácidos aminados. Cada ácido aminado é identificado com base no tempo de retenção. No topo do cromatograma apresenta-se um exemplo de integração da área de cada pico. Neste caso os picos são simulados por duas gaussianas (linhas a cheio sobrepostas aos valores experimentais), procedendo-se depois ao cálculo da área de cada gaussiana e posterior comparação com os valores obtidos para os padrões (determinando-se assim a quantidade de cada ácido aminado nas diversas amostras).

A.6. Oxidação perfórmica.

Este método faz com que os resíduos de cisteína e de metionina sejam oxidados a ácido cisteico e metionina sulfona, respectivamente. Torna-se assim possível a determinação correcta do conteúdo em cisteínas e metioninas, pois os referidos derivados não se decompõem durante a hidrólise ácida.

Prepara-se, de fresco, o seguinte reagente perfórmico: 10 ml de HCOOH, 1 ml de H₂O₂, 0.1 ml de fenol (liquefeito por ligeiro aquecimento). Deixa-se a incubar 1 hora, na ausência de luz, antes de ser usado.

A amostra é colocada num tubo de centrifuga (corex) e é seca sob uma corrente de azoto. Adicionam-se 300 µl de reagente perfórmico à amostra e deixa-se incubar durante 1 hora na ausência de luz e em gelo. Posteriormente, adicionam-se 6 ml de éter, de forma a eliminar o excesso de reagente perfórmico, e deixa-se incubar durante 30 minutos (durante este tempo o tubo é mantido num congelador a -20 °C). Após esta incubação, centrifuga-se a amostra a 6000 g durante 5 minutos. No tubo existem agora duas fases. A fase superior (éter) é retirada e adicionam-se 6 ml de éter. Após nova centrifugação, a fase superior é novamente retirada. Seca-se então a amostra sob uma corrente de azoto. Finalmente, voltam-se a adicionar 200 µl de HCl 6 N (com fenol à concentração de 1 mg/ml) e transfere-se a amostra para um tubo de hidrólise, seguindo-se posteriormente o procedimento experimental de hidrólise atrás descrito.

A.7. Preparação de soluções tampão.

Todos os tampões utilizados foram preparados a partir de diluições das soluções mãe com concentrações de 1 M. Os tampões utilizados nos sistemas de HPLC foram previamente filtrados (filtros com porosidade igual a 0.40 µm)

A.7.1. Tampão fosfato.⁶

A solução mãe do tampão de fosfato de potássio, 1 M, foi preparada a partir de duas soluções:

- Solução A: solução de fosfato de potássio monobásico, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1M (139 g em 1 l).
- Solução B: solução de fosfato de potássio dibásico, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1M (268 g em 1 l).

Dependendo do pH requerido estas soluções são misturadas em percentagens diferentes (ver tabela A.5), resultando no final um tampão 1 M de fosfato de potássio.

Tabela A.6

Percentagens para a mistura das soluções A e B em função do pH.

A	B	pH	A	B	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

A.7.2. Tampão Tris-HCl⁶

Para a preparação da solução de 1 M de tampão Tris-HCl devem-se dissolver 121 g de tris(hidroximetil)aminoetano em 800 ml de H_2O . Deve-se adicionar então o volume de HCl concentrado de acordo com o pH desejado (ver tabela A.6) e ajustar o volume a 1000 ml. O pH final deverá ser sempre confirmado, pois é sempre dependente da acidez da água utilizada.

Tabela A.7

*Preparação do tampão Tris-HCl.
Volumes de HCl a adicionar em função do pH
do tampão*

volume (ml)	pH
8.3	9.0
13.4	8.8
20.2	8.6
27.3	8.4
36.2	8.2
44.4	8.0
53.8	7.8
63.6	7.6
68.5	7.4
73.2	7.2

A.8. Titulações potenciométricas.

As titulações potenciométricas foram efectuadas em células construídas segundo os esquemas apresentados por Dutton.⁷ O potencial das soluções foi medido usando um eléctrodo de platina (Radiometer), usando como eléctrodo de referência um eléctrodo de Ag/AgCl (Radiometer). A calibração dos eléctrodos (em relação ao eléctrodo padrão de hidrogénio) foi efectuada medindo o potencial de uma solução saturada de quinidrona. O potencial medido é comparado com o potencial estimado pela seguinte equação:

$$E_Q (V) = 0.6998 - 0.059 \text{ pH} \quad [pH = 7.0 \Rightarrow E_Q \approx 0.287 \text{ V}]$$

O factor de correcção (valor a adicionar ao potenciais medidos durante a titulação) é então determinado por subtracção do potencial medido na calibração ao potencial estimado pela equação referida.

A célula usada nas titulações potenciométricas de UV-visível encontra-se representada na figura A.4. Esta célula possui um volume ideal de 3 ml (volume necessário para ambos os eléctrodos se encontrem em contacto efectivo com a solução a titular). A célula de titulação tem como base uma célula de quartzo com um percurso óptico de 1 cm e um volume de 1ml. A parte superior da célula é constituída por uma câmara de vidro com três aberturas para o eléctrodo de medida, o eléctrodo de referência e para a entrada/saída de argon e entrada de titulante.

A solução a titular é preparada da seguinte maneira. A cerca de 3 ml de tampão Tris-HCl (100 mM) ao pH desejado é adicionada uma mistura de mediadores (ver tabela A.7) escolhidos com base na gama de potenciais a titular e tendo em conta a possível interferência aos comprimentos de onda a utilizar. A concentração de mediadores a utilizar não deve exceder 1/100 da concentração de proteína utilizada. A solução assim preparada deve então ser colocada na célula de titulação e desarejada (fazendo-se passar um caudal controlado de argon pela referida solução).

Após o desarejamento, é adicionada a proteína a titular. A concentração da proteína depende apenas do valor do coeficiente de extinção molar ao comprimento de onda ao qual se vão efectuar as medidas de absorvância durante a titulação.

É então efectuada a titulação por adição de alíquotas de titulante, seguida da agitação manual da célula. Em cada passo, e após a estabilização do potencial da solução, são registados os valores de potencial e absorção aos comprimentos de onda desejados. Normalmente estes comprimentos de onda correspondem aos máximos de absorvância na região do espectro de visível. Como medida de correcção para flutuações da linha de base, deve ser registada a absorção numa região do espectro ao qual não exista absorção atribuída ao cromóforo da proteína a ser titulada.

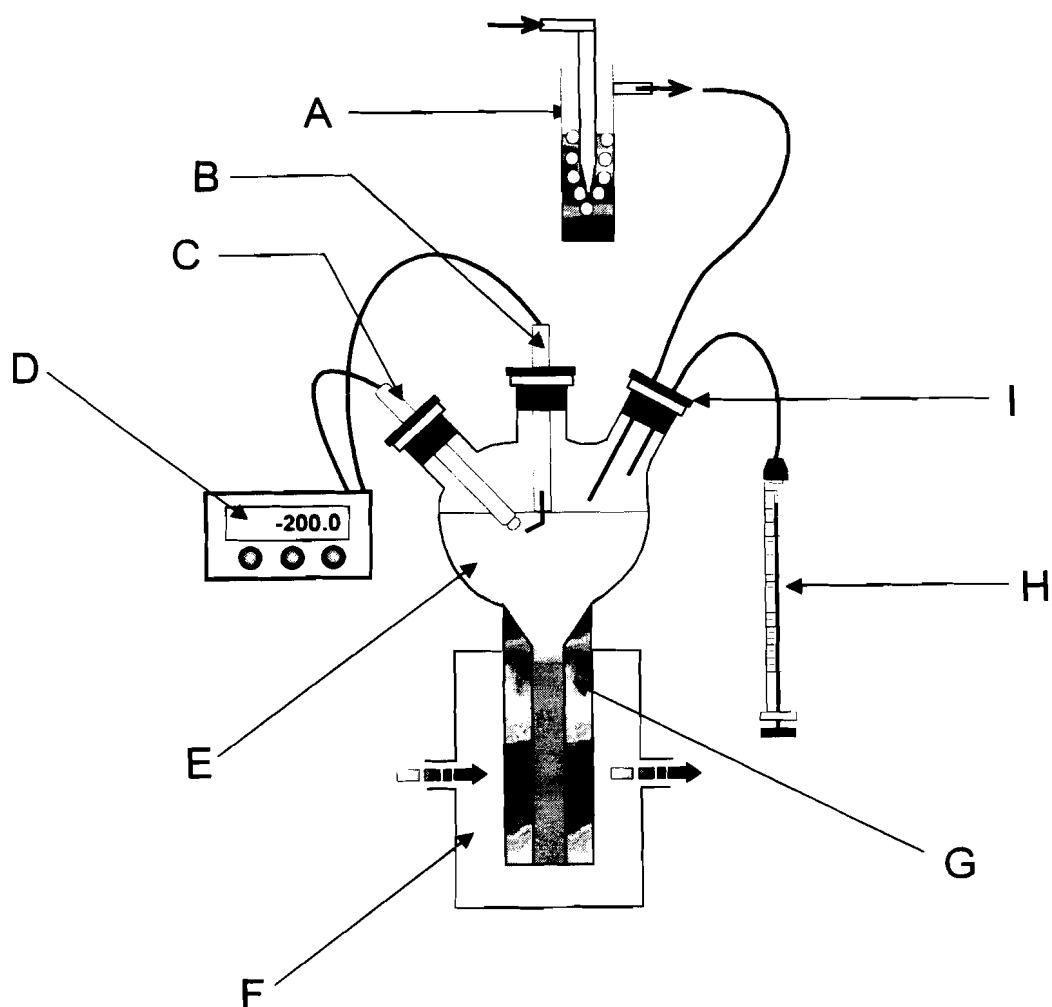


Figura A.4 - Esquema da célula de titulação para UV-visível utilizada. Legenda: (A) recipiente (borbulhador) no qual se processa a humificação do argônio; (B) eléctrodo de medida; (C) eléctrodo de referência; (D) potenciômetro; (E) solução a titular; (F) compartimento destinado à passagem de água para controlo de temperatura; (G) célula de titulação; (H) seringa Hamilton "gas tight" com titulante e (I) septo de borracha.

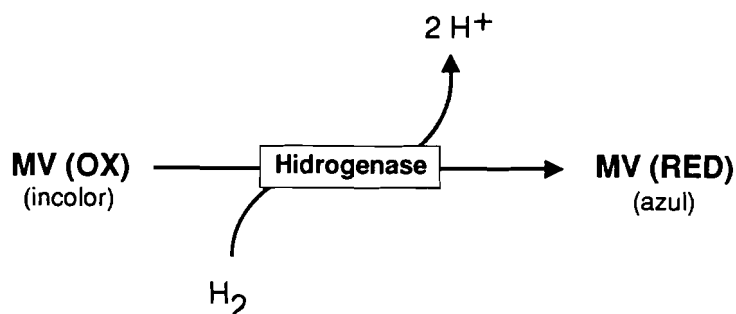
Durante a titulação a célula deve ser mantida sob uma pressão positiva de argônio, de modo a evitar a reoxidação devida à entrada de oxigénio. O argônio utilizado deve ser previamente humidificado através de uma passagem por um recipiente com água destilada. Deste modo procura-se evitar que exista uma evaporação exagerada da solução a titular. Para assegurar a manutenção de uma atmosfera verdadeiramente anaeróbica,

faz-se passar previamente o argon através de um catalisador (Model 1000 Oxygen Trap / Indicating Oxygen Trap, Chromatography Research Supplies Inc.) que possui a capacidade de remover a pequena percentagem de O₂ existente.

A preparação das amostras a potenciais controlados, destinadas à espectroscopia de RPE e Mössbauer foi efectuada na célula representada na figura A.5. À semelhança da célula de visível anteriormente descrita, esta célula possui entradas para dois eléctrodos e para um tubo adaptador que nos permite retirar amostras para tubos de RPE e células de Mössbauer. O desarejamento e manutenção da anaerobicidade é também efectuada à custa da passagem de argon na célula de titulação. Contrariamente à célula de visível, a agitação é agora efectuada através de um agitador magnético.

A titulação é feita por adição de alíquotas de titulante. Após a estabilização do valor de potencial medido, retira-se o volume necessário à preparação das amostras para o tubo de RPE e para a célula de Mössbauer. As amostras são então congeladas em azoto líquido. Deste modo é possível preparar amostras de RPE e Mössbauer equivalentes, ou seja ao mesmo valor de potencial.

Foram usados como titulantes ditionito de sódio ou viologénio de metilo. As soluções de ditionito de sódio foram preparadas em tampão Tris-HCl (pH 9.0, 0.2 M), variando as concentrações entre 35 e 70 mg/ml. As soluções foram preparadas em frascos anaeróbicos, tendo-se feito passar um caudal de argon de modo a retirar o oxigénio presente. De modo semelhante, as soluções de viologénio de metilo foram preparadas por dissolução de 1.5 a 10 mg em 5 ml de tampão Tris-HCl (pH 7.6, 0.1 M). A redução do viologénio de metilo foi efectuada por incubação da solução com hidrogenase na presença de uma atmosfera saturada em H₂, segundo a seguinte reacção:



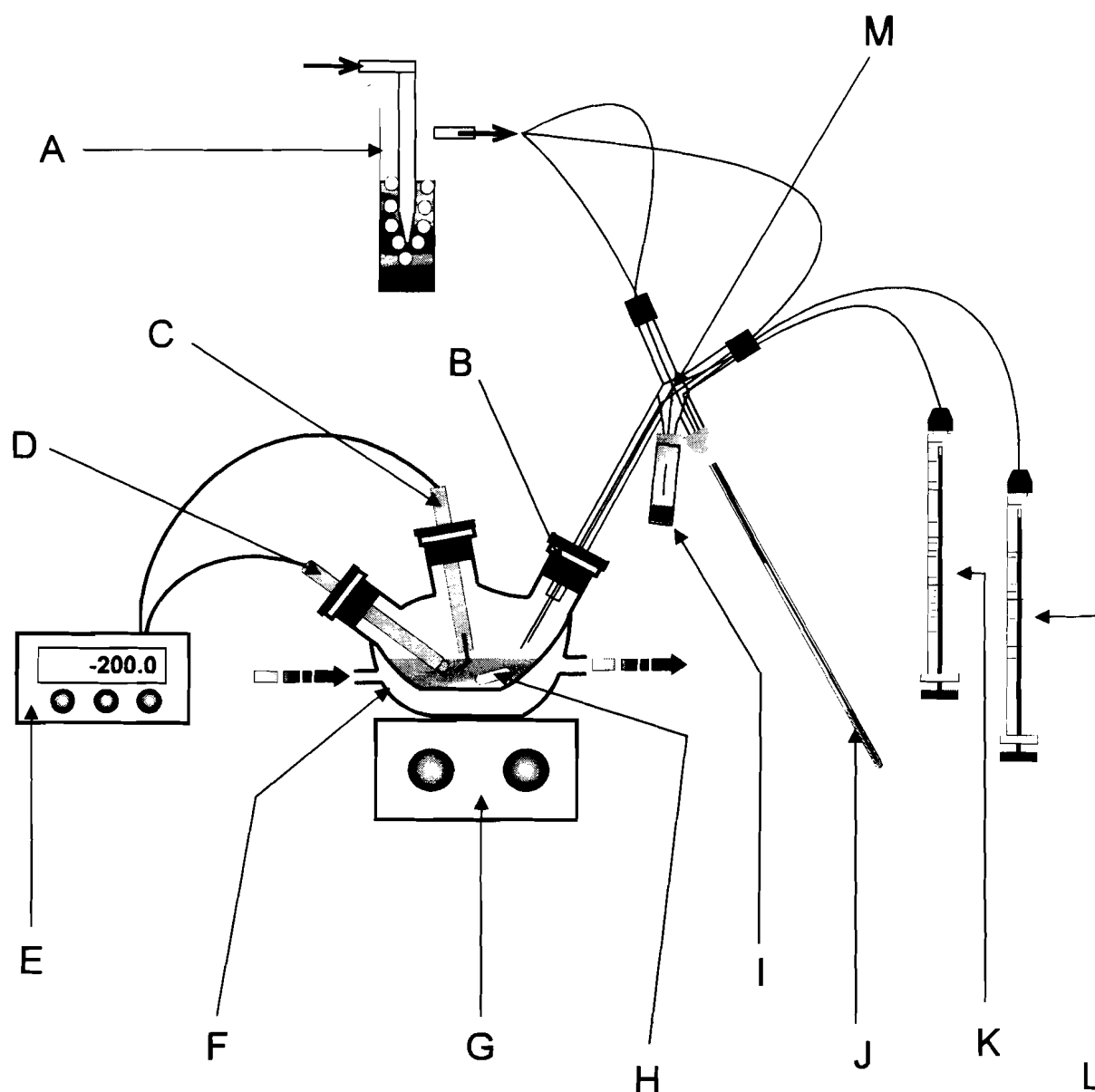


Figura A.5 - Esquema da célula de titulação para RPE/Mössbauer utilizada.

Legenda: (A) recipiente (borbulhador) no qual se processa a humidificação do argônio; (B) suba de borracha; (C) eléctrodo de medida; (D) eléctrodo de referência; (E) potenciômetro; (F) compartimento destinado à passagem de água a temperatura controlada; (G) placa de agitação; (H) barra magnética; (I) célula de Mössbauer; (J) tubo de RPE; (K) seringa Hamilton "gas tight" com titulante; (L) seringa Hamilton "gas tight" destinada a retirar as amostras de proteína; (M) adaptador em vidro que permite a recolha e distribuição das amostras de proteína.

Tabela A.8

Valores de potencial de oxidação-redução a pH 7.0 para mediadores usados em titulações potenciométricas.

Mediador	Potencial (mV)
Ferricianeto de potássio	408
<i>p</i> -fenilenodiamina tetrametilo	276
2,6 diclorofenol indofenol	217
Ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico	215
2,5-dimetilbenzoquinona	180
1,2-naftoquinona	180
1-naftol 2-sulfonato indofenol	135
Fenazina metasulfato	80
1,4-naftoquinona	60
Tionina	56
Fenazina etasulfato	55
5-hidroxi-1,4-naftoquinona	30
Galocianina	30
Azul de metileno	11
Duraquinona	5
Piocianina	-34
Ácido indigotetrasulfônico	-46
Resorufina	-51
Fenazina	-125
2,5-dihidroxi- <i>p</i> -benzoquinona	-130
2-hidroxi-1,4 naftoquinona	-152
Antraquinona 2,6 disulfonato	-184
2-hidroxi-1,4-antraquinona	-205
Antraquinona 2 sulfonato	-225
Fenosafranina	-252
Vermelho neutral	-325
Viologénio de benzilo	-358
Diquat	-361
Viologénio de metilo	-440

A.9. Determinação das constantes de calibração dos espectros de Mössbauer.

Os espectros de Mössbauer foram adquiridos ou num espectrómetro equipado com um magneto de capacidade variável (até 80 kG) ou num espectrómetro equipado com um campo magnético de 0.5 kG (orientação variável). Qualquer um dos espectrómetros trabalham no modo de aceleração constante, numa geometria de transmissão.

O zero da velocidade do espectro de Mössbauer foi calculado para o centro de gravidade do espectro de Mössbauer do ferro metálico à temperatura ambiente (ver figura A.5). A conversão das abcissas de canais para velocidade (mm/s) é efectuada por ajuste (com seis gaussianas) do espectro obtido e sabendo que as posições teóricas dos seis picos são -5.3123, -3.0760, -0.8397, 0.8397, 3.0760 e 5.3123 mm/s.

A.10. Espectrofotómetro de UV-visível.

Os espectros de UV-visível foram adquiridos num espectrofotómetro Shimadzu UV-265FS. A digitalização foi efectuada usando o programa PC-265, versão 3.1 e um IBM PC-XT.

A.11. Espectrómetro de RPE.

Os espectros de RPE foram adquiridos num espectrómetro Bruker ESP 300 equipado com uma cavidade modelo 4102M (modo perpendicular) ou ER4116DM (modo paralelo e perpendicular). Para a aquisição dos espectros a temperaturas baixas foi utilizado um criostato de fluxo contínuo ESR 900 (Oxford Instruments).

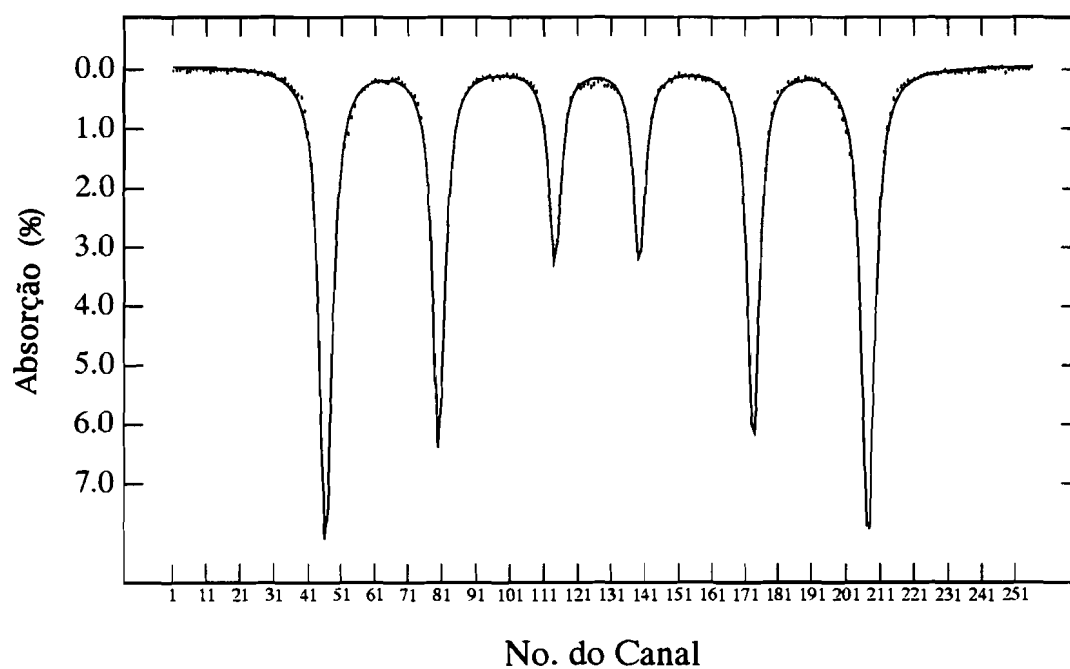


Figura A.6 - Espectro de Mössbauer do ferro metálico. A linha a cheio sobreposta aos pontos experimentais representa o resultado do ajuste do espectro experimental com seis gaussianas.

A.12. Bibliografia.

1. Lamelli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
2. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L., e Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
3. Fischer, D.S., e Price, D.C. (1964) *Clin. Chem.* **10**, 21-31.
4. Liu, M-C., e Peck, H.D., Jr. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 13159-13164.
5. Moore, S., e Stein, W.H. (1963) *Methods Enzymol.* **46**, 41-45.
6. Data for Biochemical Research, 2ª edição (1969) Ed. Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.K., Jones, K.M. Clarendon Press, Oxford.
7. Dutton, P.L. (1978) *Methods Enzymol.* **54**, 411-434.

Apêndice B.

REDZ - Programa de redução/conversão para espectros de UV-visível.

Apêndice B. REDZ - Programa de redução/conversão	
para espectros de UV-visível.	279
1. Introdução.	281
2. Descrição do Programa REDZ.	281
3. Listagem do programa.	282

B.1 Introdução.

No apêndice A referiu-se que os espectros de UV-visível foram digitalizados usando o programa PC-265 versão 3.1, para o IBM-PC. O formato final do ficheiro criado por este programa é o seguinte:

CDO, ABS

em que CDO representa o comprimento de onda e ABS a absorvância medida ao comprimento de onda CDO. Devido às resoluções utilizadas na aquisição dos dados, os ficheiros resultantes podem conter vários milhares de CDO. Podemos considerar uma aquisição normal como sendo um varrimento de 250 a 800 nm com a resolução de 0.2 nm. Neste caso o ficheiro resultante possuirá 2750 valores de CDO (e os correspondentes valores de ABS). Assim, o processamento destes ficheiros torna-se demasiado lento e difícil. É portanto essencial proceder à redução do número de pontos do ficheiro, sem que esta redução implique a perda de informação. De modo a realizar esta tarefa, foi desenvolvido o programa descrito neste apêndice, ao qual foi dado o nome de REDZ. Este programa foi escrito para a linguagem de programação TURBO C/C++ (Borland International).

B.2. Descrição do Programa REDZ.

O programa REDZ pode ser utilizado em qualquer computador que possua o sistema operativo MS DOS (a partir da versão 2.0) ou qualquer outro que com ele seja compatível. O programa REDZ funciona como qualquer outro comando do sistema operativo. A sintaxe a usar é a seguinte:

REDZ nome x1 x2 x3 [ext]

em que:

- **nome** é o nome dos ficheiros de UV-visível a reduzir (podendo ser utilizados os "wildcards" normais do MS DOS);

- **x1** é o factor de redução, ou seja o factor pelo qual se quer dividir o número de pontos existentes. Se um ficheiro possuir 2750 pontos e for utilizado o factor 5 para efectuar a redução, então o ficheiro resultante possuirá 550 pontos ($2750/5 = 550$).
- **x2** indica como efectuar a redução. Se **x2** for igual a **-m**, o programa efectuará a média dos pontos reduzidos (o novo valor de absorvância será dado pela média dos **x1** pontos anteriores. Se **x2** for igual a **-n**, o programa desprezará os pontos reduzidos. A escolha do método depende do tipo de espectro a reduzir, garantindo que o método escolhido não implique a perda de informação.
- **x3** indica qual o formato do ficheiro resultante da redução. Se **x3** for igual a **-c**, o formato é igual ao formato inicial. Se **x3** for igual a **-e**, o ficheiro possuirá duas colunas de valores, comprimento de onda e absorvância, separados apenas por um único espaço (ou seja a vírgula é omitida).
- **[ext]** é a opção que permite escolher a terminação (extensão) dos ficheiros reduzidos.

B3. Listagem do programa.

```
#include <string.h>
#include <stdlib.h>
#include <stdio.h>
#include <dir.h>
#define MAXPONTOS 3000
#define MAXPONTOS2 MAXPONTOS/2
#define MAXNOME 50
#define MAXN 200

char *nomes[MAXN];

char nome[MAXNOME];

struct pontos
{
    double x, y;
};

struct pontos espectro[MAXPONTOS];

int le_pontos( char [ ] );
void escreve( char [ ], char [ ], int );
void reduz( char [ ], int, int);
void despreza( int, int );
```

```
void media( int, int );
void avisos( int );
void limpa( int, struct pontos [ ] );
int wildcards( char [ ] );
void extensao( char [ ], char [ ] );
```

```
/*-----
                                PROGRAMA PRINCIPAL
-----*/
```

```
int main( int argc, char *argv[ ] )
{
    int l, npontos, pontosf, n_nomes;
    char *argv5;

    printf("Pedro Tavares, 1991 - REDZ 3.0 - Programa de redução/conversão de pontos.\n\n");
    if ( (argc > 6) || (argc < 5) ) avisos( 0 );
    argv5 = ( argc == 5 ) ? " " : argv[5];
    limpa( MAXPONTOS, espectro );
    pontosf = atoi( argv[2] );
    n_nomes=wildcards( argv[1] );
    for( l=0; l<=n_nomes; l++ )
    {
        printf("%s\n", nomes[l] );
        npontos = le_pontos( nomes[l] );
        reduz( argv[3], pontosf, npontos );
        npontos /= pontosf;
        extensao( nomes[l], argv5 );
        escreve( nomes[l], argv[4], npontos );
    }
    printf( "\n%d ficheiros reduzidos.\n", ++n_nomes );
    return( 0 );
}
```

```
/*-----
                                SUBROTINAS
-----*/
```

```
/* limpa() */
/* inicializa um array */
void limpa( int p, struct pontos espectro[ ] )
{
    int k;

    for( k=0; k<p; k++)
    {
        espectro[k].x = 0;
        espectro[k].y = 0;
    };
}

/* le_pontos() */
/* lê os pontos do ficheiro criado pelo PC265 */
int le_pontos( char nome[ ] )
{
    FILE *fptr;
    int n;
    char s1[6], s2[7], c1, c2;
```

```

n=0;
if ( (fptr=fopen(nome,"r"))==NULL )
{
    printf( "\nÉ impossível ler o ficheiro %s\n", nome );
    exit( 1 );
};
while( ( fscanf( fptr, "%5s%c%s", s1, c1, s2 )) != EOF )
{
    espectro[n].x = atof(s1);
    espectro[n].y = atof(s2);
    n++;
    if ( ferror(fptr) )
    {
        perror( "ERRO DE LEITURA" );
        fclose( fptr );
        exit( 1 );
    }
};
fclose( fptr );
return( n );
}

/* escreve() */
/* escreve pontos num ficheiro */
void escreve ( char nome[ ], char escolha[2], int npontos )
{
    FILE *fptr;
    int n;

    n=0;
    if ( (fptr=fopen(nome,"w"))==NULL )
        printf( "\nÉ impossível escrever no ficheiro %s", nome );
    if ( ( strcmp( escolha,"-c" )==0 ) || ( strcmp( escolha, "-C" )==0 ) )
        for( n=0; n<npontos; n++ )
        {
            fprintf( fptr, "%5.1f, %6.4f\n", \
                espectro[n].x, espectro[n].y );
            if ( ferror(fptr) )
            {
                perror( "ERRO DE ESCRITA" );
                fclose( fptr );
                exit( 1 );
            }
        }
    else if ( ( strcmp( escolha,"-e" )==0 ) || ( strcmp( escolha, "-E" )==0 ) )
        for( n=0; n<npontos; n++ )
        {
            fprintf( fptr, "%5.1f %6.4f\n", \
                espectro[n].x, espectro[n].y );
            if ( ferror(fptr) )
            {
                perror( "ERRO DE ESCRITA" );
                fclose( fptr );
                exit( 1 );
            }
        }
    else avisos( 1 );
    fclose( fptr );
}

```

```
/* reduz() */
/* reduz o ficheiro original tendo em conta a opção do utilizador */
void reduz ( char escolha[2], int numero, int npontos )
{
    if ( ( strcmp( escolha, "-m" ) == 0 ) || ( strcmp( escolha, "-M" ) == 0 ) )
        media( numero, npontos );
    else if ( ( strcmp( escolha, "-d" ) == 0 ) || ( strcmp( escolha, "-D" ) == 0 ) )
        despreza( numero, npontos );
    else avisos( 2 );
}

/* media() */
/* faz a média durante a redução dos pontos */
void media( int numero, int npontos )
{
    int j, k, s, t;
    double d, ex, ey;

    d=0;
    j=t=0;
    d=(double)numero;
    do
    {
        ex=ey=0;
        s=j+numero;
        for( k=j; k<s; k++ )
        {
            ex += ( espectro[k].x );
            ey += ( espectro[k].y );
        }
        espectro[t].x = ex / d;
        espectro[t].y = ey / d;
        j+=numero;
        t++;
    }
    while( j<=npontos );
}

/* despreza() */
/* despreza pontos intermediários */
void despreza( int numero, int npontos )
{
    int j, k;

    k=0;
    for( j=0; j<npontos; j+=numero, k++ )
        espectro[k] = espectro[j];
}

/* wildcards() */
/* procura ficheiros no disco */
int wildcards( char nome[] )
{
    struct fblk fblk;
    int j, n, done;

    j=0;
    done = findfirst( nome, &fblk, 0);
```

Apêndice B

```
while( !done )
{
    nomes[j] = calloc( strlen(ffblk.ff_name) + 1, sizeof(char) );
    strcpy( nomes[j], ffblk.ff_name );
    done=findnext( &ffblk );
    j++;
}
return( j-1 );
}

/* extensao() */
/* defina a extensão que o utilizador pretende
   usar no ficheiro reduzido. */
void extensao( char nome[], char s[3] )
{
    int i;

    strcat( nome, s );
    if ( strchr( nome, '.' ) != NULL )
    {
        i = strlen( nome);
        strcpy( &nome[i-6], &nome[i-3] );
    }
}

/* avisos() */
/* dá a mensagem de como utilizar o programa */
void avisos ( int erro )
{
    switch ( erro )
    {
        case 0: printf ("Formato: C:\>redz filename(s) x1 x2 x3 [ext]\n\n");
                printf ("filename(s) : nome dos files a reduzir \
\\(podem ser utilizados \"wildcards\"\\).\n\
x1 : número de pontos a reduzir. \n\
x2 : -m para fazer a média, -n para não a fazer. \n\
x3 : -c => CSV, -e => apenas espaço.\n\
[ext] : extensão dos ficheiros reduzidos.\n");break;
        case 1: printf ("Opção incorrecta: deve escolher -c ou -e."); break;
        case 2: printf ("Opção incorrecta: deve escolher -m ou -n."); break;
    }
    exit( 1 );
}
```